

ACTA

PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

2.

2014

APHGAO 84, (043) 53–88. (2014)



A C T A PHARMACEUTICA H U N G A R I C A

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

Főszerkesztő:

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet
1092 Budapest, Högyes E. u. 9.
Tel.: 217-0891;
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

Felelős szerkesztő:

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,
1092 Budapest, Högyes E. u. 7–9.
Tel.: 217-0927;
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

A szerkesztőbizottság tagjai:

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,
Tóthfalusi László

A szerkesztőség címe – Correspondence:

Acta Pharmaceutica Hungarica
1092 Budapest, Högyes Endre u. 9.

A főszerkesztő munkatársa:

Hankó Zoltán MGYT,
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

TARTALOM

<i>Pomázi Anita, Ambrus Rita, Szabóné Révész Piroska: Meloxikám-tartalmú porinhalációs készítmény stabilitásának vizsgálata</i>	55
<i>Varga Erzsébet, Marcu Simona Tiinde, Adoryán Boglárka: A Xanthii spinosi herba alkalmazása a jóindulatú prosztata megnagyobbodás kezelésében</i>	63
<i>Ujhelyi Zoltán, Vecsernyés Miklós, Bácskay Ildikó: Önemulgeáló rendszerek formulálása tenzid komponenseinek élő sejtekre gyakorolt hatásának ismeretében</i>	69
<i>Seres Adrienn, Ducza Eszter, Gáspár Róbert: A nyers heretej gesztagén hatásainak vizsgálata patkányban</i>	77
<i>Hornýák Lajos, Nagy Zsolt, Tólos Zsuzsanna, Endrei Dóra, Ágoston István, Csákvári Tímea, Boncz Imre: A biohasznos gyógyszerek árversenyének tapasztalatai Magyarországon</i>	83

CONTENTS

<i>Pomázi, A., Ambrus, R., Szabóné Révész, P.: Stability testing of meloxicam-containing microcomposites</i>	55
<i>Varga, E., Marcu, S.T., Adoryan, B.: Use of Xanthii spinosi herba in treatment of benign prostate hypertrophy.</i>	63
<i>Ujhelyi, Z., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Formulation and characterization of self-microemulsifying drug delivery systems according to their cytotoxic attributes</i>	69
<i>Seres, A., Ducza, E., Gáspár, R.: Investigation of gestagenic effect of raw drone milk in rats.</i>	77
<i>Hornyaák, L.: Nagy, Zs., Tálos, Zs., Endrei, D., Ágoston, I., Csákvári, T., Boncz, I.: Experiences with price competition of biosimilar drugs in Hungary</i>	83

Meloxicám-tartalmú porinhalációs készítmény stabilitásának vizsgálata

POMÁZI ANITA, AMBRUS RITA, SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA*

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai Intézet
6720 Szeged, Eötvös utca 6

Levelezési cím: anita.pomazi@pharm.u-szeged.hu

Summary

Pomázi, A., Ambrus, R., Szabóné Révész, P.: **Stability testing of meloxicam-containing microcomposites**

The formulation of inhalation agents is a major challenge for the pharmaceutical technologist. The innovative inhalation formulations mean a new area of indication for active pharmaceutical ingredients. Among pulmonary preparations, dry powder inhalers (DPIs) can ensure stability, a high payload and patient convenience. Our aim was to develop a carrier-based, crystalline co-spray-dried DPI product containing the low-solubility meloxicam (MX). Instead of the classical approach based on micronization to prepare drug particles followed by blending with a carrier, co-spray-drying of the MX/mannitol (M)/additives was performed in a one-step process. The product parameters were optimized with PVA, PVP, TWEEN and LEU as additives in order to improve the drug deposition in the lung. The mean particle size in the M-based systems was in the required range (2-5 μm). The particle dimensions, morphology and physical-chemical properties of the microcomposites were suitable for the pulmonary administration of DPI formulations based on the applicability of efficacy and safety. We investigated the influence of temperature and relative humidity on the physical-chemical properties with a view to optimization of the analytical methods, with the expiration date as a limiting parameter. The most important parameters of the DPI are the particle size, the particle size distribution, the morphology, the crystallinity of the drug and the dissolution rate. The DPI quality is assessed by the determination of aerodynamic properties such as the aerodynamic particle size distribution, the mass median aerodynamic diameter (MMAD) and the fine particle fraction (FPF). Critical parameters were determined by thermoanalytical studies (TG), X-ray diffraction, electron microscopy and laser diffraction. The chemical stability of the components was tested by FT-IR spectroscopy. The in vitro aerosol performance was tested by using the multistage Andersen Cascade Impactor.

Összefoglalás

A mikrokompozitok formulálását ún. ko-mikronizálással végeztük el, a termék tulajdonságait polivinil-pirrolidon K25 (PVP), polivinil-alkohol 3-88 (PVA) mellett L-leucin (LEU) alkalmazásával alakítottuk ki. Korszerű technológiával 2-5 μm -es hatóanyagkristályokat tartalmazó ko-mikronizált termékeket állítottuk elő, amelyek mind fizikai-kémiai, mind morfológiai szempontból egyaránt megfelelnek a pulmonális alkalmazhatóság kritériumainak. A DPI (Dry Powder Inhaler) készítmények alkalmazhatóságának alapja a hatékonyság és a biztonságosság. A befolyásoló paraméterek meghatározására valós idejű és gyorsított stabilitási teszteket végeztünk el, amellyel célunk az analitikai módszerek optimalizációja, valamint a lejáratí időt limitáló paraméterek meghatározása volt. A DPI készítmények esetén a kritikus paraméterek a következők: a szemcseméret-és eloszlás, a morfológia, a végtermék maradék nedvességtartalma, valamint a hatóanyag és a vivőanyag kristályossági paramétereinek változása. A kritikus paramétereket termoanalitikai vizsgálatokkal (TG), porröntgen, elektronmikroszkóp és lézer diffrakció segítségével határoztuk meg, a komponensek kémiai stabilitását FT-IR spektroszkópiával vizsgáltuk. A légzőrendszerben való deponálódást az Andersen kaskád impaktor modell segítségével jellemeztük.

Kulcsszavak: mikrokompozit, ko-porlasztás, porinhaláció, stabilitás, meloxicám.

1. Bevezetés

A korszerű inhalációs gyógyszerkészítmények formulálása a gyógyszeripari fejlesztések aktuális feladata. Ezen a területen a legfontosabb kritérium a szemcseméret, a morfológia, a hatóanyag gyors kioldódása a külső alveoláris pH tartományban, valamint az aerodinamikai sajátságok biztosítása.

A kristályos sajátságok megtartása a készítmény stabilitása szempontjából kedvező [1, 2]. A porinhalációs készítményeket az aerodinamikai tulajdonságok alapján minősítik [3]. A legfontosabb paraméterek: az aerodinamikai szemcseméret, az átlagos aerodinamikai átmérő, valamint a finom részecske frakció (Ph. Eur. 7.2. 2012).

Napjainkban az új típusú hordozó rendszerek

formulálása a készítményfejlesztés fókuszába került és a korszerű segédanyagok lehetőséget adnak az innovatív porinhalációs készítmények előállításához [4]. A porinhalációs készítmények jelentős hányada hordozó-alapú, amelyben a mikronizált méretű hatóanyag egy speciális felületű laktózzal alkot fizikai keveréket. A fejlesztésben újszerű megközelítés a mannit, mint hordozó alkalmazása az interaktív fizikai keverékek előállításában [5], valamint koporlasztással való együtt alkalmazása, amely végeredményként szilárd, kristályos mikrokompozitot eredményez. A hordozók és a segédanyagok jelentősen befolyásolhatják a porinhalációs készítmények fizikai-kémiai sajátságait tárolás és alkalmazás során. A tárolás során bekövetkező relatív páratartalom (RH) változása a DPI készítmények diszpergálhatóságának csökkenését okozhatja [6, 7]. Nemzetközi kutatások foglalkoznak a hordozók fizikai sajátságainak hatásával a részecskeméretre és a morfológiára egyaránt [8, 9]. Napjainkban fókuszba került a hőmérséklet és a RH befolyásoló hatásának vizsgálata a DPI aerodinamikai sajátságaira nézve [10]. A legtöbb publikált vizsgálatban azonban a készítmények csak rövid ideig voltak kitéve a magasabb hőmérsékletnek.

Az Amerikai Élelmiszer és Gyógyszerügynökség (FDA) és az Európai Inhalációs Társaság meghatározta az új DPI készítményekkel szemben támasztott követelményeket [11-14]. Az FDA megköveteli a DPI készítmények stabilitás vizsgálatát, amelynek során meg kell határozni a tárolási körülmények hatását a szemcseméretre, valamint a porforma nedvesség felvételét.

A tárolási körülményeket a Nemzetközi Harmonizációs Konferencia (ICH) által rögzített irányelvek írják le az ipar számára kidolgozott „Guideline of Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A (R2)” elnevezésű szakmai irányelvben [15, 16]. Az ICH követelmények a következők: gyorsított stabilitási teszt esetén $40 \pm 2^\circ\text{C}$ és $75 \pm 5\%$ RH, valamint a valós idejű teszt esetén $25 \pm 2^\circ\text{C}$ és $60 \pm 5\%$ RH.

Korábbi munkánk során meghatároztuk az előállítási paramétereket, amellyel ko-porlasztással formulált mikrokompozitokat állítottunk elő, meloxikám (MX) pulmonális alkalmazása céljából [17]. A fejlesztés újszerű megközelítése a D-mannit (M) hordozóként történő alkalmazása, ugyanis porlasztás során kontrollált szemcseméretű, kristályos szerkezetű, szférikus szemcséket alkot [18]. A preformuláció vizsgálatok során különböző hordozó alapú rendszereket fejlesztettünk az MX bejuttatásának és a kitapadó frakció növelésének érde-

kében. Meghatároztuk az előállítási paramétereket és a különböző segédanyagok, valamint azok koncentrációjának az MX és a mikrokompozitok szemcseméretére és morfológiájára gyakorolt hatását [19]. A klasszikus technológiával ellentétben (a porkeverék előállítása), az MX tartalmú mikrokompozitokat a MX/M/segédanyagok (PVP, PVA, TWEEN, LEU) ko-porlasztásával egy lépéses folyamatban állítottuk elő. Ez az eljárás új tendenciát képvisel a porinhalációs készítmények formulálásában. Az előzetes citotoxicitás vizsgálatok során igazoltuk, hogy az alkalmazott dózisban a termékek nem gyakorolnak a Calu-3 sejtek életképességére kedvezőtlen hatást, a 24 órás vizsgálat időtartama alatt [20].

Munkánk célja az általunk fejlesztett DPI készítmény stabilitás vizsgálatának elvégzése. A vizsgált termékeket a preformulációs vizsgálat eredménye alapján választottuk ki. Vizsgáltuk a hőmérséklet és a páratartalom befolyását a fizikai-kémiai, valamint az aerodinamikai sajátságokra. Továbbá meghatároztuk az alkalmazott polimerek (PVP, PVA) szemcseméretre, morfológiára és kémiai stabilitásra gyakorolt hatását. Az aerodinamikai sajátságok változását Andersen kaszkád impaktor segítségével követtük. További célunk volt az MX lokális hatású DPI-ként való formulálása, ugyanis vizsgálatok folynak a MX tüdődaganat kezelésében betöltött szerepéről. Nem-kissejtes tüdőrákban a karcinogenezis során a sejtek felszínén expresszálandó COX-2 receptorok számát hatékonyan csökkenti. Jelenleg ilyen indikációval MX tartalmú készítmény nincs forgalomban, így a formulálás innovatív feladatnak tekinthető.

2. Anyagok és módszerek

2.1 Anyagok

A munkában alkalmazott vízben nem oldódó hatóanyag tehát a meloxikám (MX). Kémiaiilag az enolsav-származékok csoportjába tartozó vegyület, a hivatalos IUPAC neve 4-hydroxy-2-methyl-N-(5-methyl-2-thiazolyl)-2H-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide). A formulálás során korszerű, a terápiában biztonsággal alkalmazható hordozót és segédanyagokat alkalmaztunk. Indifferens vivőanyagként a β -D-mannitot (M), a szemcsék egyediségét biztosító polimereket (polivinil-pirrolidon K25 (PVP), polivinil-alkohol 3-88 (PVA) alkalmaztunk. L-leucin (LEU) aminosav hozzáadásával az aerodinamikai sajátságok növelhetőek.

I. táblázat

A ko-porlasztással előállított termékek összetétele

Összetételek	Anyagok	Tömeg
MX-M-PVP-LEU	Meloxikám	5,00 g
	Mannit	5,00 g
	Polivinil-pirrolidon K-25	0,025 g
	L-leucin	0,2 g
MX-M-PVA-LEU	Meloxikám	5,00 g
	Mannit	5,00 g
	Polivinyl alkohol 3-88	0,1 g
	L-leucin	0,2 g

2.2 Módszerek

2.2.1. Meloxikám tartalmú mikrokompozitok előállítása

Az összetételeket 100 g vizes szuszpenzióra vonatkoztatva a I. táblázat mutatja. Az FT-IR analízis elvégzése céljából, a ko-porlasztás eredményezte kölcsönhatások igazolására fizikai keverékeket (FK) állítottunk elő, amelyek összetétele a mikronizált termékekével egyezik meg.

A szilárd fázisú termék előállítása során a hatóanyag szemcseméret csökkentését dezintegráló művelettel, nedves őrléssel végeztük el (Ultraturrax -UT-6500 és 24000 rpm 10 perc). Az UT-vel előállított presuszpenzióból mikrosuszpenziót készítettünk nagy nyomású homogenizátor (Avestin Emulsiflex C3, Kanada) 1500 bar 10 ciklus alkalmazásával. A végső formát porlasztva szárítással alakítottuk ki (Büchi Mini Dryer B-191). A ko-porlasztás paramétereit mindkét termékre vonatkozóan a II. táblázat mutatja.

2.2.2. Stabilitás vizsgálat

A stabilitás vizsgálatokat nemzetközi irányelvek alapján terveztük meg (ICH – International Conference on Harmonization Q1A (R2) – Stability Testing of New Drug Substances and Products, 2003). A terméket pulmonális célra alkalmas kemény zselatin porkapszulába töltöttük. A mintákat 25 °C-on 60%-os relatív páratartalmú (RH) és 40 °C-on 75%-os relatív páratartalmú (RH) közegben tároltuk 6 hónapon keresztül. A mintavételi

időpontok 0. nap, 10. nap, 1 hónap, 2 hónap, 3 hónap és 6 hónap voltak.

2.2.3. Szemcseméret

A szemcseméretet lézer diffrakciós eljárással határoztuk meg (Malvern Mastersizer Scirocco 2000, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Megközelítően 2 g terméket mértünk a rezgő tálcára. A diszperziós levegő áramlását 2,0 bar nyomás biztosította.

2.2.4. Pásztázó elektronmikroszkópia

A szemcsék morfológiáját, habitusát pásztázó elektronmikroszkóp segítségével határoztuk meg (Hitachi S4700, Hitachi Scientific Ltd., Japán). A szemcsék bevonását (Bio-Rad SC 502, VG Microtech, Anglia) arany-palládiummal végeztük, a termékek felületén az elektromos vezetés kiváltására 1,3-13 mPa nyomású levegőt használtuk fel.

2.2.5. Nedvességtartalom meghatározása termogravimetriás méréssel

A száraz porok maradék nedvességtartalmának vizsgálatára Mettler Toledo TG 821[®] készüléket alkalmaztunk, a program lefuttatását és az eredmények kiértékelését a STAR[®] V9.1 programmal végeztük el (Mettler Inc., Schwerzenbach, Svájc) állandó nitrogén gáz átáramoltatása mellett (100 mL min⁻¹).

II. táblázat

A porlasztva szárítás paramétere

Összetétel	Bemenő hőmérséklet °C	Kimenő hőmérséklet °C	Áramlási sebesség (ml perc ⁻¹)	Levegő áramlási sebessége (L h ⁻¹)	Levegő áramlási aránya (m ³ perc ⁻¹)
MX-M-PVP-LEU	130	77	4,0	600	0,065
MX-M-PVA-LEU	131	80	4,0	650	0,065

III. táblázat

Az impaktor egyes szintjein áthulló szemcseméret 60 L perc⁻¹ áramlási sebességet alkalmazva

Kaszád impaktor szintjei	Áthulló szemcseátmérő (μm)
Szint -1	9,0
Szint 0	5,8
Szint 1	4,7
Szint 2	3,3
Szint 3	2,1
Szint 4	1,1
Szint 5	0,7
Szint 6	0,4
Szűrő	< 0,4

2.2.6. In vitro aerodinamikai vizsgálat

Az aerodinamikai sajátságok meghatározására a Gyógyszerkönyvben is hivatalos Andersen kaszkád impaktor modellt (ACI) (Copley Scientific Ltd., Nottingham, Egyesült Királyság) alkalmaztuk. A terméket kemény zselatin kapszulába töltöttük (3-as méret) és bevitelre az RS01 eszközt (Plastiape, Olaszország) választottuk. Az impaktor 7 felfogó tányért tartalmaz, amelyet a részecskék hatékony kitapadása érdekében 1% w/v Span 85-ciklohexán elegyével bevontunk. A III. táblázat mutatja az egyes szinteken kitapadó részecske átmérő értékeit.

Az impaktort vákuum pumpához csatlakoztatuk (High-capacity Pump Model HCP5, Critical Flow Controller Model TPK, Copley Scientific Ltd., Nottingham, Egyesült Királyság). Az átáramló levegő sebességét ellenőriztük (Flow Meter Model DFM 2000, Copley Scientific Ltd., Nottingham, Egyesült Királyság) és úgy szabályoztuk, hogy a mennyisége

60 l min⁻¹ legyen, a bemeneti nyílásnál. Az egyes tányérokat metanol/puffer (60/40 v/v %) elegyével kvantitatívan mérőlombikba mostuk, majd a hatóanyag mennyiségét UV/Vis spektroszkópiával 362 nm hullámhosszon határozzuk meg.

2.2.7. Porröntgen vizsgálat

A fizikai sajátságok, és a kristályos jelleg jellemzésére a X-ray pordiffrakciós vizsgálatokat használtunk fel. Ezen sajátságok mérésére az (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Németország) alkalmaztunk, ahol az anód cső Cu (Kα=1,5405 Å), a sajátságokat egységesen 40kV feszültségen és 40 mA áramerősségen határoztuk meg.

2.2.8. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR)

Az FT-IR spektrumot Bio-Rad Digilab Division FTS- 65A/896 FT-IR készülék segítségével vettük fel, 400–4000 cm⁻¹-es intervallumban 4 cm⁻¹-es optikai felbontás alkalmazásával. A méréseket szilárd fázisban standardizált KBr mátrixban végeztük. A 150 mg-os KBr pasztillák préselése 10 tonna nyomáson történt. A préselmények MX-re vonatkoztatott tartalma 0,5 mg volt.

2.2.9. Statisztikai analízis

A statisztikai értékelést a Statistical for Windows programmal végeztük el és az eredmények között tapasztalt változásokat egyszempontos varianciaanalízissel határoztuk meg. Akkor tekintettük az értéket szignifikánsnak ha a p érték < 0,05.

IV. táblázat

A mikrokompozitok szemcsemérete 0. napon és 180. napon, 25 °C-on 60 % RH, valamint 40 °C-on 75 % RH tárolási körülmények mellett

Összetételek		D (0,1) μm	D (0,5) μm	D (0,9) μm
MX-M-PVP-LEU	0. nap	1,53	3,05	5,68
	180. nap, 25 °C, 60%	1,73	3,50	6,15
	180. nap, 40 °C, 75%	1,75	3,58	6,03
MX-M-PVA-LEU	0. nap	1,64	3,11	5,81
	180. nap, 25 °C, 60%	1,81	3,10	5,62
	180. nap, 40 °C, 75%	1,79	3,37	6,11

V. táblázat

Maradék nedvességtartalom meghatározása termogravimetriás eljárással.

Összetételek	Maradék nedvesség tartalom (%)		
	0. nap	25 °C, 60% RH 180. nap	40 °C, 75% RH 180. nap
MX-M-PVP-LEU	0,35	0,52	0,64
MX-M-PVA-LEU	0,37	0,44	0,45

3. Eredmények

A preformulációs vizsgálataink alapján határoztuk meg azt a két összetételt melyek a gyógyszerformára jellemző értékeik alapján megfelelnek a pulmonális alkalmazhatóság kritériumainak. Ennek a két összetételnek a stabilitás vizsgálatát végeztük el az új gyógyszerhordozó rendszerekre vonatkozó szabályok szerint.

Szemcseméret megoszlás vizsgálat

A stabilitás vizsgálatokhoz kapcsolódóan elvégeztük a termékek szemcseméret eloszlási vizsgálatát is (IV. táblázat), ami a következő eredménnyel zárult. Az átlagos szemcseméret mindkét termék esetében a pulmonális kritériumoknak megfelelő tartományban van ($1-5\ \mu\text{m}$), kismértékű növekedés volt tapasztalható. A tárolási körülmények emelésével nem változtak a szemcseméret-eloszlási adatok.

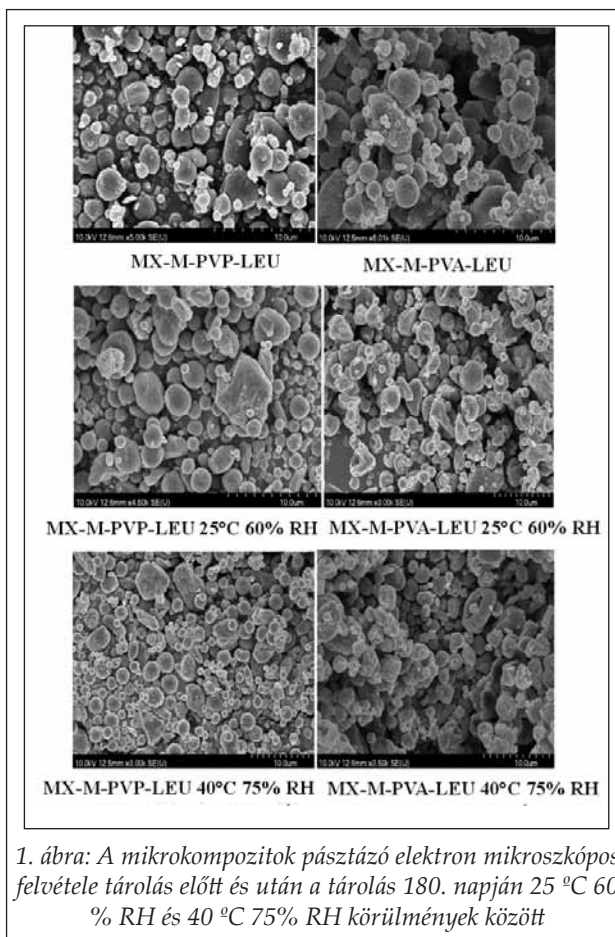
A termékek homodiszperz szemcseméret eloszlása $25\ ^\circ\text{C}$ -on és $40\ ^\circ\text{C}$ -on való tárolás során szignifikánsan nem változott ($p < 0,05$) (4. táblázat).

Morfológia

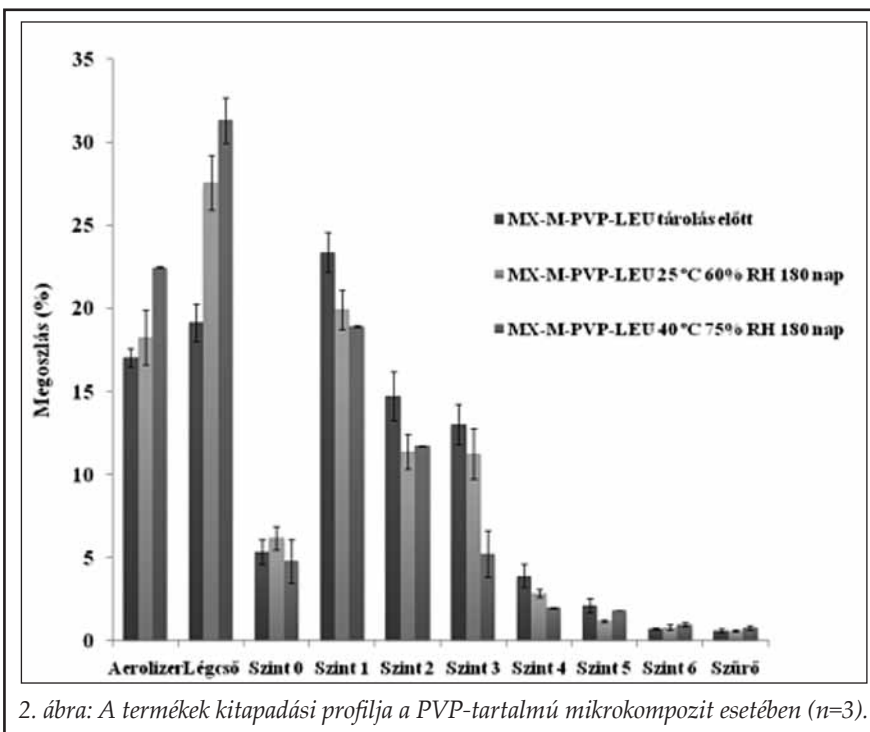
Az elektronmikroszkópos felvételekkel igazoltuk (1. ábra), hogy a porlasztva szárított termékekre szférikus morfológia jellemző, amely a pulmonális alkalmazásnál előnyös. A SEM felvételek azt mutatják, hogy mindkét tárolási körülmény esetében a szemcsék morfológia nem változik, s a felületen sem láthatóak a mikrokompozit sérülésére vagy oldódására utaló nyomok.

Maradék nedvességtartalom

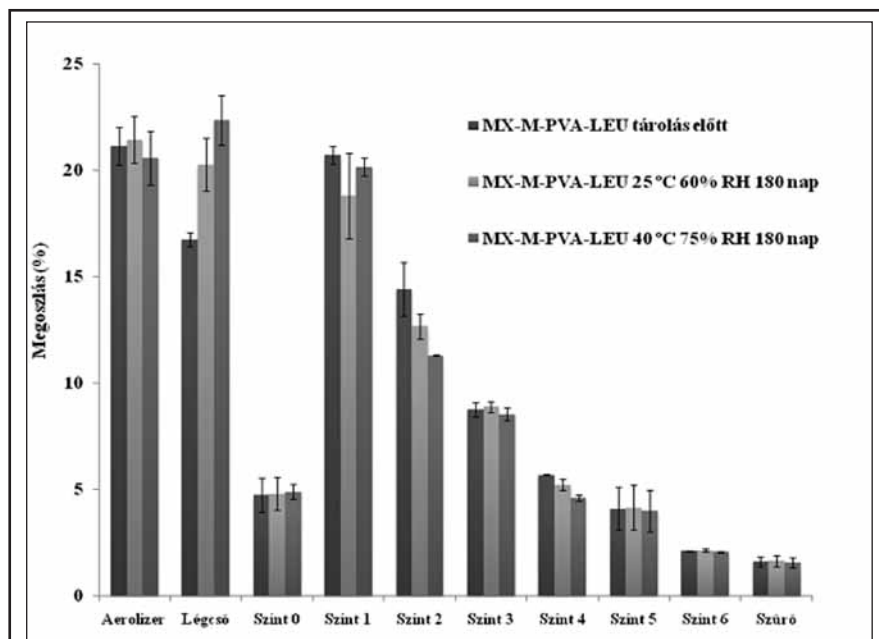
A porlasztva szárítással előállított inhalációs készítmények víztartalmát termogravimetriai vizsgálat segítségével határoztuk meg (V. táblázat). A bemért termékek esetében a fűtés hatására eltávozó gázok által okozott tömegcsökkenést vizsgáltuk, a felfűtést $280\ ^\circ\text{C}$ -ig végeztük. A vizsgálat során megállapítottuk, hogy a termékek víztartalma 1% alatt



van. A 60% RH és a 75% RH nem okozott különbséget a mikrokompozitok nedvességfelvételét tekintve, azonban a polimer hidrophil jellege befolyásolja



2. ábra: A termékek kitapadási profilja a PVP-tartalmú mikrokompozit esetében ($n=3$).



3. ábra: A termékek kitapadási profilja a PVA-tartalmú mikrokompozit esetében ($n=3$).

azt. A PVP-tartalmú rendszerek mindkét tárolási körülmény esetében több vizet vesznek fel a környezetből, ami a polimer hidrophil karakterére vezethető vissza. A ko-porlasztás paraméterei azonban megfelelőnek bizonyultak mindkét polimer alkalmazása mellett, ugyanis a mikrokompozitok nedvességtartalma az Európai Gyógyszerügynökség által meghatározott felső érték (1%) alatt van mind a kiindulási, mind a tárolt minta esetében.

Aerodinamikai paraméterek

A különböző szinteken való eloszlást a százalékos

megoszlás arányában tüntetjük fel. A termékek aerodinamikai tulajdonságának értékelésekor a 2-5 szinteken kitapadó hatóanyag mennyiségét összegeztük, amit a finom részecske frakció (FRF) értékével adtunk meg. A FRF a szemcseméretnek azon százalékos összetétele, ami az 1-5 μm -es tartományba esik. Szakirodalmak értékelése alapján abban az esetben optimális az összetétel, ha ez az érték 35 % felett van (2-3. ábra).

A PVP-t és PVA-t tartalmazó rendszereket LEU-al formulálva kedvező értékeket kaptunk, ami a LEU diszperzítást fokozó sajátosságaira vezethető vissza. A FRF a MX-M-PVP-LEU esetében $53,05 \pm 1,13$, míg a MX-M-PVA-LEU mikrokompozitnál $57,5 \pm 1,0$ %-nak adódott. Az aerodinamikai átmérőre vonatkozó kritériumok megegyeznek a szemcseméretre vonatkozókkal, vagyis az 1-5 μm -es tartomány az *in vitro* depónálódás esetében is meghatározó. Az eredmények alapján elmondható (VI. táblázat), hogy mindkét termék a tárolás után is megfelel a porinhalációs rendszerekkel szemben támasztott követelményeknek, tehát az általunk alkalmazott körülmények sem befolyásolják a kitapadás jellegét a valós idejű tárolási körülményekhez és a kiindulási összetételekhez képest.

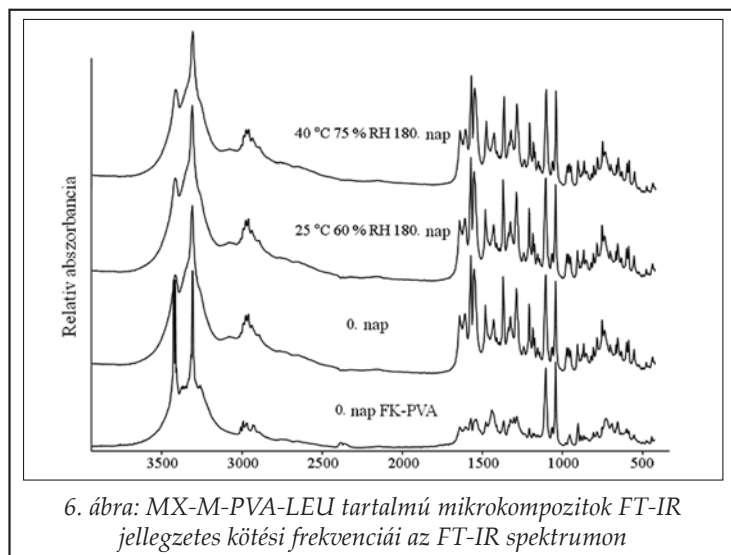
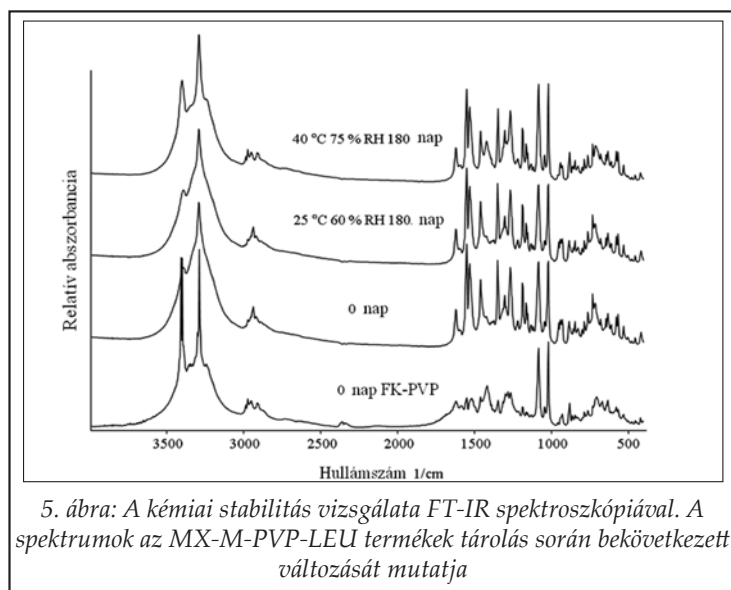
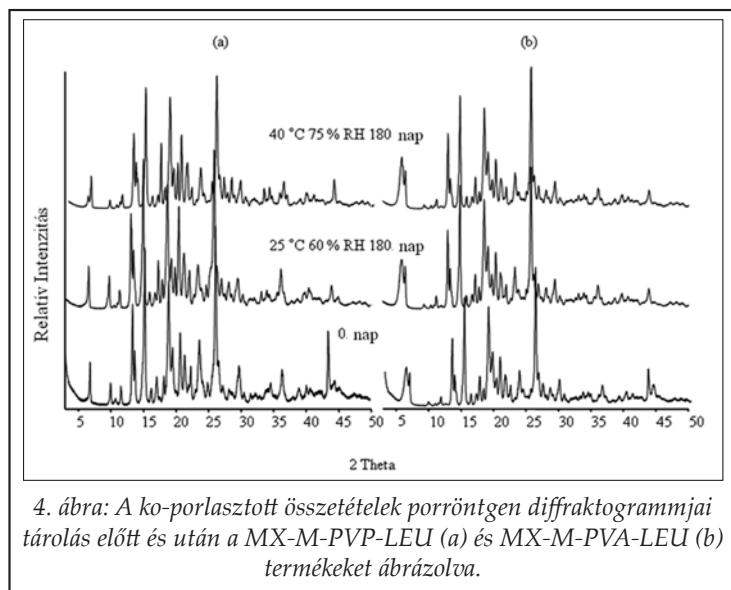
VI. táblázat

A mikrokompozitok aerodinamikai paramétereinek összefoglalása. A vizsgálatot a Gyógyszerkönyvben is hivatalos Andersen kaszkád impaktorral 60 L perc^{-1} áramlás alkalmazásával határoztuk meg RS01 beviteli eszköz segítségével ($n=3$).

Összetételek		Bemért termék (mg)	Felszabadt termék (mg)	Felszabadt dózis (mg)	FRD (mg)	FRF (%)	Átlagos aerodinamikai átmérő (μm)
MX-M-PVP-LEU	0. nap	$3,03 \pm 0,18$	$3,03 \pm 0,18$	$1,48 \pm 0,09$	$0,60 \pm 0,07$	$53,05 \pm 1,13$	$3,52 \pm 0,13$
	25 °C 60 % RH	$3,25 \pm 0,07$	$3,25 \pm 0,07$	$1,54 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,01$	$45,76 \pm 2,58$	$3,67 \pm 0,83$
	40 °C 75 % RH	$3,21 \pm 0,23$	$3,21 \pm 0,23$	$1,51 \pm 0,1$	$0,24 \pm 0,02$	$41,16 \pm 2,81$	$3,91 \pm 0,45$
MX-M-PVA-LEU	0. nap	$3,55 \pm 0,21$	$3,55 \pm 0,42$	$1,21 \pm 0,07$	$0,29 \pm 0,05$	$57,50 \pm 1,0$	$3,04 \pm 0,17$
	25 °C 60 % RH	$3,31 \pm 0,06$	$3,31 \pm 0,06$	$1,58 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,06$	$54,10 \pm 0,60$	$3,19 \pm 0,31$
	40 °C 75 % RH	$3,12 \pm 0,45$	$3,12 \pm 0,45$	$1,15 \pm 0,16$	$0,54 \pm 0,03$	$52,5 \pm 2,2$	$3,39 \pm 0,11$

FRD: Finom Részecske Dózis

FRF: Finom Részecske Frakció



Szerkezeti jellemzők

A MX kristályos jellege bizonyítható porröntgen segítségével, a jellemző csúcsok 13,22, 15,06, 26,46 és 26,67 2θ értékeknél olvashatók le. A mannit két kristálmódosulata porröntgen segítségével szintén azonosítható. A felvett görbék a 4. ábra mutatja. A mannit sajátosságaira jellemző csúcsok a következő 2θ értékeknél jelennek meg: 16,9, 14,74, 10,62, 21,15 és 29,54. Az eredmények alapján elmondható, hogy a mikronizált termékekben hatóanyag és a vivőanyag is kristályos formában van jelen, ami a rendszerek stabilitása miatt előnyös. Ezt támasztják alá a tárolt minták diffraktogramjai, a relatív intenzitás a tárolás során nem változik a kiindulási termékekhez viszonyítva.

A kémiai stabilitást FT-IR spektroszkópiával vizsgáltuk. Az 5. és a 6. ábra a 0. és a 180. napon felvett spektrumokat hasonlítja össze. Az FT-IR spektrumon a MX karakterisztikus kötési a 3291 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} (N-H) és 1580 cm^{-1} (C-O) láthatók. A termékekben a MX kristályos formában van jelen sem a mikronizálás sem a ko-porlasztás nem eredményezett amorf terméket. A $3500\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ -nél látható relatív abszorbancia növekedést a ko-porlasztás során kialakuló asszociált O-H kötések és a H-kötés okozza a szilárd fázisú termékekben. A kölcsönhatás a MX és a polimerek között jön létre [21]. Az spektrumok értékelésekor megállapítható, hogy a karakterisztikus kötési frekvenciák helyzete nem változott az OH, =O és NH csoportfrekvenciák esetében, valamint bomlásra utaló abszorbancia változást nem tapasztaltunk. Megállapítható továbbá, hogy a MX-M-PVP-LEU tartalmú rendszer esetében a MX és a PVP között kialakult hidrogén-híd kölcsönhatás erőssége csökken ($3500\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$) a tárolás során. A kölcsönhatás jellege a $25\text{ °C } 60\%$ RH esetében nem mutat változást a kiindulási termékekhez viszonyítva. A két tárolási körülmény kémiai stabilitásra gyakorolt hatásának értékelésekor megállapíthatjuk, hogy a „forszírozott” körülmények a PVP-tartalmú rendszerek esetében a szerkezeti jellemzők megváltozását indukálják.

Az MX-M-PVA-LEU tartalmú minták FT-IR analízise során nem tapasztaltunk változást a tárolás során.

4. Összefoglalás

Munkánk célja volt a preformuláció során kiválasztott, kedvező paraméterekkel rendelkező MX tartalmú mikrokompozitok (MX-M-PVP-LEU, MX-M-PVA-LEU) stabilitás vizsgálatának elvégzése és a kritikus paraméterek monitorozása a tárolási idő függvényében. A stabilitási vizsgálatok során a relatív páratartalom és a hőmérséklet hatását határoztuk meg a fizikai-kémiai tulajdonságokra és az aerodinamikai sajátságokra egyaránt. Megállapítottuk, hogy tárolás után az MX-M-PVP-LEU és MX-M-PVA-LEU rendszerek szemcsemérete, morfológiája és százalékos megoszlása megfelel a pulmonális alkalmazásnak A FRF értéke mindkét esetben 50% feletti érték, mintegy 20%-al meghaladja a forgalomban lévő készítmények aerodinamikai értékeit (35%). Az FT-IR eredmények azt mutatták, hogy az MX-M-PVA-LEU összetételű mikrokompozitok a stabilitási vizsgálatok során fizikai és kémiai szempontból stabilak és a vizsgált tulajdonságok szignifikáns változást nem mutatnak a „friss” termékekhez viszonyítva. A nedvesfelfelvétel tendenciája alapján is kisebb mértékű eltérést tapasztaltunk a PVA tartalmú rendszerek esetében. A stabilitási vizsgálatok értékelése alapján elmondható, hogy a PVA tartalmú termék fizikai-kémiai szempontból stabilnak tekinthető, az FRF értéke meghaladja a jelenleg forgalomban lévő készítmények aerodinamikai paramétereit. A PVP-tartalmú rendszerek kémiai stabilitás eredményei alapján további vizsgálatokat kell végezni a kölcsönhatás befolyásoló hatásának meghatározására a farmakológiai hatás, valamint az aerodinamikai paraméterekre nézve. Azonban a PVP-tartalmú mikrokompozitok szemcseméret-megoszlása, morfológiája megfelel a pulmonális alkalmazás kritériumainak, aerodinamikai sajátságai kedvezőek. A stabilitás vizsgálat eredményei alapján tehát mindkét polimer-tartalmú összetételt alkalmasnak találtuk *in vivo* állatkísérletek végzésére, a hatás igazolására, valamint az *in vitro-in vivo* korreláció meghatározására.

Köszönetnyilvánítás

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azo-

nosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

IRODALOM

1. Buckton, G.: Adv. Drug. Deliv. Rev. 26, 17–27 (1997).
2. Hickey, A. J.: Physical and Biological Basis for Therapy. In: Lenfant, C. (ed): Inhalation aerosol- Physical and biological basis for therapy. New York, 2006. pp. 451.
3. Wong, W., Crapper, J., Chan, H. K., Traini, D., Young, P. M.: J. Pharm. Biomed. Anal. 51, 853–857 (2010).
4. Pomázi, A., Choatal, A., Ambrus, R., Szabóné Révész, P.: Gyógyszerészet 58, 1–9 (2014).
5. Kaialy, W., Nokhodchi, A.: Int. J. Pharm. 448, 58–70 (2013).
6. Borgstrom, L., Asking, L., Lipniunas, P.: J. Aerosol. Med. 18, 304–310 (2005).
7. Young, P., Sung, A., Traini, D., Kwok, P., Chiou, H., Chan, H.: Pharm. Res. 24, 963–970 (2007).
8. Chew, N. Y. K., Tang, P., Chan, H. K., Raper, J. A.: Pharm. Res. 22, 148–152 (2005).
9. French, D. L., Edwards, D. A., Niven, R. W. J.: Aerosol. Sci. 27, 769–783 (1996).
10. Islam, N., Stewart, P., Larson, I., Hartley, P.: J. Pharm. Sci. 94, 1500–1511 (2005).
11. Young, P. M., Price, R., Tobyn, M., Buttrum, M., Dey, F.: Drug. Dev. Ind. Pharm. 29, 959–966 (2003).
12. Zhu, K., Tan, R. B. H., Nga, W. K., Shen, S., Zhou, Q., Heng, P. W. S.: Aerosol. Sci. 39, 510–524 (2008).
13. FDA (CDER) Draft Guidance for Industry Metered Dose Inhaler (MDI) and Dry Powder Inhaler (DPI) Drug Products. CMC Documentation (1998).
14. Inhalanda. Preparations for inhalation. Pharm. Eur. Suppl. 0671, 984–989 (1999).
15. Commission of the European Communities, Committee for Proprietary Medicinal Products Note for Guidance. - Stability testing of new drug substances and products. – III, 3335–92, (1993).
16. Byron, P.: J. Aerosol. Med. 11, S11–S12 (1998).
17. Pomázi, A., Ambrus, R., Sipos, P., Szabó-Révész, P.: J. Pharm. Biomed. Anal. 56, 183–190 (2011).
18. Ashurst, I., Malton, A., Prime, D., Sumby, B.: Pharmaceutical Sci. Tech. Today, 3, 246–256 (2000).
19. Pomázi, A., Buttini, F., Ambrus, R., Colombo, P., Szabó-Révész, P.: Eur. Polymer J. 49, 2518–2527 (2013).
20. Ambrus, R., Pomázi, A., Réti-Nagy, K., Fenyvesi, F., Vecsernyés, M., Szabó-Révész, P.: Pharmazie 66, 549–550 (2011).
21. Jafar, M., Mhg, D., Shareef, A.: Int. J. Applied Pharm. 2, 22–27 (2010).

A *Xanthii spinosi herba* alkalmazása a jóindulatú prosztatata megnagyobbodás kezelésében

VARGA ERZSÉBET¹, MARCU SIMONA TÜNDE², ADORYÁN BOGLÁRKA¹

¹Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszerészeti Kar, Farmakognózia és Fitoterápia tanszék, Marosvásárhely

²Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Orvosi Kar, Szövettan tanszék, Marosvásárhely

Levelezési cím: Dr. Varga Erzsébet, Str. Gh. Marinescu nr.39. 540 139 Tg. Mures, RO

e-mail: verzebet@yahoo.com

Summary

Varga, E., Marcu, S.T., Adoryan, B.: *Use of Xanthii spinosi herba in treatment of benign prostate hypertrophy*

The aim of our study was to assess the efficacy of *Xanthii spinosi herba* in the treatment of rats with benign prostate hypertrophy induced under experimental conditions.

Benign prostate hypertrophy (BPH) was induced by per oral (p.o.) administration of testosterone undecanoate (40 mg Undestor capsules) in concentrations of 15 mg/kg/day and 35 mg/kg/day. Drug induced BPH was treated with *Xanthii spinosi herba* as infusion and tincture.

Drug induced benign prostate hyperplasia in rats was accompanied by a series of physical changes, like weight increase and shinier fur, and also by behavioral changes (increased appetite, aggression, increased libido). Prostate size was higher in all groups of animals treated with testosterone undecanoate compared to the control group. The morphopathological study of the organs taken from slaughtered animals, showed some microscopic changes in the prostate. In animals treated with *Xanthii spinosi herba* (infusion and tincture) we observed a decrease in volume of the prostate, while the microscopic changes were absent.

Key words: *Xanthii spinosi herba*, benign prostate hyperplasia, animal experiences

Összefoglaló

Kísérleteink célja a *Xanthii spinosi herba* hatékonyságának kiértékelése kísérletes körülmények között indukált jóindulatú prosztatata megnagyobbodás kezelésében patkányokon.

A jóindulatú prosztatata-hipertrofiát tesztoszteron undekanoát kapszulák (Undestor 40 mg-os kapszula) 15 mg/kg/nap és 35 mg/kg/nap koncentrációk perorális beadásával váltottuk ki. Az indukált jóindulatú prosztatata megnagyobbodást a *Xanthii spinosi herba* infúzióval és tinktúrával kezeltük. A gyógyszerek által indukált jóindulatú prosztatata megnagyobbodást a patkányokon fizikai elváltozások követték, mint például az állatok súlygyarapodása, csillogóbb szőrme és viselkedésszerű változások (fokozott étvágy és szexuális vágy, agresszivitás). A tesztoszteron undekanoáttal kezelt összes állatnál a prosztatata mérete megnagyobbodott a kontroll csoporthoz viszonyítva. A felboncolt állatok szerveinek kórszövet-tani vizsgálata mikroszkópikus elváltozásokat mutatott a prosztatata szintjén. A *Xanthii spinosi herba*-val (infúzió és tinktúra) kezelt állatoknál csökkent a prosztatata térfogata és a mikroszkópikus elváltozások már nem voltak jelen.

Kulcsszavak: *Xanthii spinosi herba*, jóindulatú prosztatata megnagyobbodás, állatkísérletek.

Bevezető

A *Xanthium spinosum* L. (Asteraceae), szúrós szerbtövis, lágyszárú, egyéves növény, világszerte elterjedt gyomnövény [1]. Hatóanyagai közül említésre méltók a szeszkviterpén laktonok (xanthanolidok), szitoszterolok, polifenolos vegyületek. A népgyógyászatban használják, mint diuretikum, diaforetikum, gyulladáscsökkentő a jóindulatú prosztatata megnagyobbodás kezelésében [2, 3]. A prosztatata megbetegedésekben ajánlott több romániai készítmény gyakori összetevője. Tanulmányunkban laboratóriumi körülmények között, állatkísérletekkel követtük a jóindulatú prosztatata megnagyobbodás kezelését a *Xanthii spinosi herba*-ból készült készítményekkel.

Állatkísérleteink célja a *Xanthii spinosi herba* al-

kalmazása patkányokon, kísérletes körülmények között indukált jóindulatú prosztatata megnagyobbodás kezelésében.

Kísérleteink során tiszteletben tartottuk az Európai Unió és az érvényben levő hazai állatvédelmi szabályokat, kerülve az állatkínzásokat.

Anyag és módszer

A jóindulatú prosztatata megnagyobbodást tesztoszteron undekanoáttal váltottuk ki (Undestor 40 mg kapszulából), 15 mg tesztoszteron undekanoát/ ttkg/nap, valamint 35 mg tesztoszteron undekanoát/ ttkg/nap adagolva p.o. és a kezeléseket *Xanthii spinosi herba* infúzióval és *Xanthii spinosi herba* tinktúrával végeztük [4, 5].

Megalkottuk az állatcsoportokat, 1 és 6 év kö-

I. táblázat

Az állatok elosztása csoportonként

Állatcsoportok		Prostata megnagyobbodás indukálása (50 nap)	Eutanázia	Prostata megnagyobbodás kezelése
I. csoport (7 állat)		Nem	Nem	Nem
II. csoport (28 állat)	1	15 mg tesztoszteron undekanoát /ttkg /nap (7 állat)	Igen	Nem
	2	15 mg tesztoszteron undekanoát /ttkg /nap (7 állat)	Nem	2% infúzió
	3	15 mg tesztoszteron undekanoát /ttkg /nap (7 állat)	Nem	20% tinktúra
	4	15 mg tesztoszteron undekanoát /ttkg /nap (7 állat)	Nem	Nem
III. csoport (28 állat)	1	35 mg tesztoszteron undekanoát /ttkg /nap (7 állat)	Igen	Nem
	2	35 mg tesztoszteron undekanoát /ttkg /nap (7 állat)	Nem	2% infúzió
	3	35 mg tesztoszteron undekanoát /ttkg /nap (7 állat)	Nem	20% tinktúra
	4	35 mg tesztoszteron undekanoát /ttkg /nap (7 állat)	Nem	Nem

zötti felnőtt, szexuális életet nem folytatott patkányokból. Az állatok testsúlyai 280 g és 370 g között ingadoztak, az átlag testsúly $320,00 \pm 2,626$ g volt.

Három állatcsoportot alkottunk, az első csoportban 7 állat volt, melyek kontrollként szolgáltak és nem részesültek kezelésben, a második csoportban 28 állat 15 mg tesztoszteron undekanoátot kapott p.o., ttkg-ként, 50 napig, és a harmadikban 28 állat 35 mg tesztoszteron undekanoátot kapott p.o.szállítva 50 napig (I. táblázat).

Az állatokat 50 nap után (7-7 állatot) felboncoltuk, követtük a jóindulatú prostata megnagyobbodás jeleit. Az egyes állatok szerveit 10% formalin keverékben rögzítettük, parafinban beágyasztuk és a 7 mikronos metszeteket eozin-hematoxilin-nel festettük. A szövettani metszeteket veséből, prosztatából és herékből készítettük [6, 7].

A megmaradt 21-21állatnál a jóindulatú prostata megnagyobbodás kezelését kezdtük el a Xanthii spinosi herba-ból készült infúzióval és tinktúrával [8]. A megmaradt állatok, amelyek a tesztoszteron undekanoátot 15 mg ttkg/nap dózisban kapták, három alcsoportba osztottuk: 7 állat szerbtövisből készült 2%-os infúziót, más 7 állat szerbtövis tinktúrát és további 7 állat nem részesült kezelésben. Ugyanilyen felosztásban részesültek azok az állatok is, amelyek a tesztoszteron undekanoátot 35 mg ttkg/nap dózisban kapták. A kezeléseket 60 napig folytattuk. A kezeléseket után az állatokat felboncoltuk (lásd I. táblázat), szövettani vizsgálatokat végeztünk a fent leírt módon.

Eredmények és megbeszélés

A jóindulatú prostata megnagyobbodás indukálása után a tesztoszteron a patkányoknál testsúlynövekedést, a prostata megnagyobbodását és az állatok magatartásának megváltozását idézte elő (agresszivitás, szexuális vágy növekedés, szőrzet csillogóvá válása, étvágy fokozódás).

Az étvágynövekedés 20 nap után volt észlelhető, mely a későbbiekben a testsúlynövekedésben nyilvánult meg. A bundájuk, szőrzetük 28 nap után vált fényesebbé és az agresszivitás és a szexuális vágy 30 nap után vált kihangsúlyozottá.

A statisztikai adatok segítségével megállapítható, hogy a prostata súlya az állatok testsúlyához viszonyítva megnőtt mindazon állatcsoportokban, ahol a tesztoszteron undekanoát 2. koncentrációját alkalmaztuk (35 mg ttkg/nap) és az eredmények egy normális eloszlást követtek (II. és III. táblázat).

Azok az eredmények, amelyek statisztikailag jelentősek voltak, a megbízhatósági határ 95 %-os eloszlásában voltak, (hibahatár 5 %) ($p < 0,05$). Szintén a statisztikai adatokra hivatkozva, kísérleteink során hatékonyabbnak bizonyult a Xanthii spinosi herba infúzió, mint a tinktúra.

Szövettani eredmények kiértékelése a jóindulatú prostata megnagyobbodás kiváltása után:

– I. csoportban (7 állat, amelyek nem kaptak tesztoszteront):

A gyakori hematoxilin-eozinnal festett veséből készített metszeteken, a kéregállományban nor-

II. táblázat

Az állatok prosztata súlyának változása a testsúlyhoz képest- Bonferroni teszttel végzett statisztikai számítások a II. csoportban

Állatcsoportok	Kiemelt különbségek	t	Sig. P < 0,05	Összegezve	Konfidencia intervallum 95%
I - II. 4	-0,01149	6,056	Igen	****	-0,01724 – -0,005742
I - II. 1	-0,0159	8,381	Igen	****	-0,02165 – -0,01016
I - II. 2	0,01228	6,471	Igen	****	0,006531 – -0,01803
I - II.3	0,005103	2,689	Nem	ns	-0,0006459 – -0,01085
II. 4 - II. 1	-0,00441	2,325	Nem	ns	-0,01016 – -0,001337
II. 4 - II. 2	0,02377	12,53	Igen	****	0,01802 – -0,02952
II. 4 - II.3	0,0166	8,745	Igen	****	0,01085 – -0,02234
II. 1 - II. 2	0,02818	14,85	Igen	****	0,02244 – -0,03393
II. 1 - II.3	0,02101	11,07	Igen	****	0,01526 – -0,02676
II. 2 - II.3	-0,00718	3,782	Igen	**	-0,01293 – -0,001427
<i>One way analysis of variance</i>					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
P < 0.05	yes				
Number of groups	5				
F	75,23				
R squared	0,9093				

III. táblázat

Az állatok prosztata súlyának változása a testsúlyhoz képest- Bonferroni teszttel végzett statisztikai számítások a III. csoportban

Állatcsoportok	Kiemelt különbségek	t	Sig. P < 0,05	Összegezve	Konfidencia intervallum 95%
I - III. 4	-0,032	11,65	Igen	****	-0,04033 – -0,02368
I - III. 1	-0,04264	15,52	Igen	****	-0,05097 – -0,03432
I - III. 2	-0,01029	3,744	Igen	**	-0,01861 – -0,001962
I - III. 3	-0,01432	5,212	Igen	***	-0,02265 – -0,005997
III. 4 - III. 1	-0,01064	3,871	Igen	**	-0,01896 – -0,002312
III. 4 - III. 2	0,02172	7,903	Igen	****	0,01339 – -0,03004
III. 4 - III. 3	0,01768	6,435	Igen	****	0,009357 – -0,02601
III. 1 - III. 2	0,03235	11,77	Igen	****	0,02403 – -0,04068
III. 1 - III. 3	0,02832	10,31	Igen	****	0,01999 – -0,03665
III. 2 - III. 3	-0,00404	1,468	Igen	ns	-0,01236 – -0,004291
<i>One way analysis of variance</i>					
P value	< 0,0001				
P value summary	****				
P < 0.05	yes				
Number of groups	5				
F	20,75				
R squared	0,7345				

mális szerkezettel rendelkező vese glomerulusokat, proximális és disztális kanyarulatot csatornákat figyelhetünk meg, és ugyanúgy a velőállományban normális szerkezettel rendelkező

Henle-kacsokat és gyűjtőcsatornákat. A *herékből* készített metszeteken, normális szerkezettel rendelkező, megőrzött spermatogenezissel rendelkező herecsatornácskákat láthattunk, míg a

herecsatornácskák között elhelyezkedő kötőszövetben csak kevés Leydig-féle sejt csoportokat (tesztoszteront termelő sejtek) észleltünk egyenletes eloszlásban. A **prostatából** készített metszeteken, kétrétegű hámmal bélelt mirigyeket és kivezető csatornákat figyelhattunk meg. Egyes mirigyekben néhány vakuoláris citoplazmával rendelkező szekréciós sejtek jelentek meg, eozinofil szekréciós sejtek között elhelyezkedve [9].

– II.1. (7 állat, amelyek 15 mg/kg *ttsúly-nyi* tesztoszteront kaptak 50 napig) és a

III.1. (7 állat, amelyek 35 mg/kg *ttsúly-nyi* tesztoszteront kaptak 50 napig) csoportokban:

A gyakori hematoxin-eozinnal festett **veséből** készített metszeteken, a kéregállomány halványabban jelent meg; a keskeny vizeleti térrel körülvett (alig látható) vesetestecskék nagyobbak voltak, valamint a proximális kanyarulat csatornákat halványabb citoplazmával és jól látható kefeszegéllyel rendelkező sejtek bélelték, míg a velőállomány normális szövettani szerkezetű volt. A **herékből** készített metszeteken mindkét herében fokozott spermatogénézissel rendelkező herecsatornácskákat figyelhattunk meg (előalakok számára), míg a tesztoszteront termelő Leydig-féle sejt csoportok nem voltak észlelhetők. A **prostatából** készített metszeteken, kétrétegű hámmal bélelt acinusokat és kivezető csatornákat figyelhattunk meg. Egyes acinusokat egy többrétegű, redőzött hám bélelte, valószínűleg bazális sejtek hipreplázia számára. Ugyanúgy egyes acinusokban néhány vakuoláris citoplazmával rendelkező szekréciós sejtek jelentek meg, eozinofil szekréciós sejtek között elhelyezkedve. A prostata strómája viszont kevésbé fejlett, oedémás volt. Helyenként, az acinusok között vérzéses nekrosis volt észlelhető.

Szövettani eredmények a Xanthii spinosi herba-ból készült készítményekkel történő kezelések után.

– II.2. (7 állat, 15 mg/kg *ttsúly-ra* kapták a tesztoszteron undekanoátot 50 napig és utána Xanthii spinosi herba-ból készült infúziót 60 napig) és a II.3. (7 állat, 15 mg/kg *ttsúly-ra* kapták a tesztoszteron undekanoátot 50 napig és utána Xanthii spinosi herba-ból készült tinktúrát 60 napig) csoportokban:

A gyakori hematoxin-eozinnal festett **herékből** készített metszeteken mindkét herében normális spermatogénézissel rendelkező herecsatornácskákat figyelhattunk meg, valamint kevesebb tesztoszteront termelő Leydig-féle sejtcso-

portokat. A **prostatából** készített metszeteken redőzött kétrétegű hámmal bélelt acinusok és kivezető csatornák voltak jelen, és helyenként sima felszínű, kétrétegű hámmal bélelt, kitágult acinusokat és kivezető csatornákat. Egyes mirigyekben néhány vakuoláris citoplazmával rendelkező szekréciós sejtek jelentek meg, eozinofil szekréciós sejtek között elhelyezkedve. A prostata strómája ugyanúgy kevésbé fejlett, oedémás volt.

– III.2. (7 állat, 35 mg/kg *ttsúly-ra* kapták a tesztoszteron undekanoátot 50 napig és utána Xanthii spinosi herba-ból készült infúziót 60 napig) és a III.3. (7 állat, 35 mg/kg *ttsúly-ra* kapták a tesztoszteron undekanoátot 50 napig és utána Xanthii spinosi herba-ból készült tinktúrát 60 napig) csoportokban:

A **vesékből** készített metszeteken a kéregállomány halványabb volt, a keskeny vizeleti térrel körülvett (alig látható) vesetestecskék nagyobbak voltak, a proximális kanyarulat csatornákat halványabb citoplazmával és jól látható kefeszegéllyel rendelkező nagyobb sejtek bélelték. A velőállomány normális szövettani szerkezetű volt. A **herékből** készített metszeteken normális spermatogénézissel rendelkező herecsatornácskákat láthattunk, néhány Leydig-féle sejt csoportokkal a here intersticiális szövetében. A Leydig-féle sejtek szemcsés eozinofil citoplazmával (normális szerkezetűek) rendelkeztek. A gyakori hematoxin-eozinnal festett **prostatából** készített metszeteken kitágult acinusokat és kivezetőcsatornákat figyelhattunk meg, amely közül egyesek laphámmal mások valamint kétrétegű, és csak helyenként többrétegű, redőzött, hámmal bélelték. Más mirigyes szerkezeti elemekben gazdag és vakuoláris, halvány citoplazmával rendelkező szekréciós sejtek voltak, sötét eozinofil sejtek között elhelyezkedve, valamint normális strukturájú elemek is voltak megfigyelhetők. A strómában csak kevés kollagén- és simaizom rostot láthattunk. [9,10].

Következtetések

Állatkísérleteink során a Xanthii spinosi herba-val történő kezelések után a következőket észleltük:

1. Az állatok a kezeléseket jól bírták, jól tűrték és mellékhatások nem jelentkeztek.
2. A statisztikai számítások azt mutatják, hogy a jóindulatú prostata megnagyobbodás kiváltása után a prostata súlya a testsúlyokhoz viszonyítva megnőtt. Az eredmények egy normális eloszlást követtek.

3. A tesztoszteron undekanoáttal kezelt állatcsoportokban (függetlenül a koncentrációtól), a kontroll csoport állataihoz viszonyítva a megnőtt prosztátában olyan szövettani elváltozások alakultak ki, amelyek jóindulatú prosztata megnagyobbodásra utaltak – acinusok és kivezetőcsatornák voltak jelen, amelyek többrétegűek, redőzött hámmal rendelkeztek és ezek a hámsejtek hyperplasiára utaltak. Mindazok ellenére a prosztata strómája nem mutatott megfelelő elváltozásokat. A herékben viszont fokozott spermatogenezis volt megfigyelhető, míg a tesztoszteron termelő sejtek nem voltak észlelhetők.
 4. A *Xanthii spinosi herba*-val történő kezeléseket (infúzió és tinktúra) a prosztata súlya (enyhén) csökkent és ez a súlycsökkenés azoknál a patkányoknál volt statisztikailag szignifikáns, amelyeket a *Xanthii spinosi herba*-ból készült infúzióval kezeltünk.
 5. A *Xanthii spinosi herba*-ból készült készítményekkel kezelt állatcsoportoknál a szervekből (herék, vese, prosztata) készített metszetek nem mutattak jelentős kórszövettani elváltozásokat. A prosztata acinusaiban a többrétegű hám (hyperplasia) csak helyenként volt jelen, míg a herékből és veséből készített metszetek morphopatológiai elemzése nem mutatott jelentős kórszövettani elváltozásokat az állatcsoportokon belül.
- Eredményeink alapján elmondható, hogy a

Xanthii spinosi herba (különösen az infúzió) jótékony hatású volt a prosztata súlyának csökkentésében és a mikroszkópikus elváltozásoknál csökkentette a hiperpláziára utaló jeleket. Ezen jelek arra utalnak, hogy a népgyógyászati megfigyelések alapján sikeresen alkalmazhatók a vizsgált növényi részek a jóindulatú prosztata megbetegedésekben.

IRODALOM

1. ***Flora Republicii Populare Romîne, Vol IX, Academia Republicii Populare Romîne kiadó, Bukarest, 1964, 308-309 old.
2. Petcu P., Andronescu E., Petrișor Gh.: *Farmacia* 28(4), 217-221 (1980).
3. Petcu P., Bordaș E., Andronescu E., Filipaș V., Zeic A.: *Farmacia* 31(1) 1-4 (1983).
4. Li Z., Wang Y.X., Zheng S., Xiang Z.Q., Han Y.F.: *Zhonghua Nan Ke Xue*, 8(2), 130-3 (2002).
5. Scolnik M. D., Servadio C., Abramovici A.: *Journal of Andrology* 15(4), 287-297 (1994).
6. Bancroft J.D., Stevens A.: *Theory and Practice of Histological Techniques*, Fourth edition, Churchill Livingstone Kiadó, 1996, 99-112 old.
7. Mureșan C., Găboreanu M., Bogdan A.T., Baba A.I.: *Tehnici de histologie normală și patologică*, Ceres kiadó, Bukarest, 1974
8. ***Farmacopeea Româna, Ediția a X-a, Medicala kiadó, Bukarest, 1993, pp: 1043-10462.
9. Bostwick D.G., Cheng L.: *Urologic Surgical Pathology*, Second edition, Mosby Elsevier Kiadó, 2008, 381-442 old.
10. Mills S.E.: *Histology for pathologists*, Third edition, Lippincot Williams and Wilkins Kiadó, 2007, 923-942 old.

Önemulgeáló rendszerek formulálása tenzid komponenseinek élő sejtekre gyakorolt hatásának ismeretében

UJHELYI ZOLTÁN, VECSENYÉS MIKLÓS, BÁCSKAY ILDIKÓ*

Debreceni Egyetem, Gyógyszertechnológiai Tanszék
4032 Debrecen Nagyterdei krt. 98., Magyarország
Levelezési cím: bacskay.ildiko@pharm.unideb.hu

Summary

Ujhelyi, Z., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: **Formulation and characterization of self-microemulsifying drug delivery systems according to their cytotoxic attributes**

The aim of this study was to develop and examine novel drug delivery systems upon the cytotoxic behaviour of their tenside components. Different self-emulsifying combinations have been formulated by water dilution and oil dilution method with various previously tested tensides and co-tensides [11]. The visual properties registered against the increment of the applied tenside component in Ternary triangular diagrams. Cartesian coordinate calculation was applied to select the adequate compositions. Self-emulsifying drug delivery systems are widely used for enhanced bioavailability of orally administered pharmaceuticals. [12]. Full particulars of topical application of these systems have not been evaluated yet. In our study the cellular effects of the applied amphiphilic tensides on human Caco-2 and HeLa cell monolayers as dependent upon their chemical structures and physicochemical properties have been evaluated. Cytotoxicity investigation was performed on Caco-2 and HeLa cells by MTT method. HeLa cells as in vitro model of cervix and Caco-2 cell monolayers as convenient and reliable in vitro models of the gastrointestinal tract have been chosen.

According to the results of the formulation procedures it can be determined that each developed SMEDD mixtures belong to type IIIa or IIIb in the lipid formulation classification system (LFCS) proposed by Pouton [12]. All of the formulated systems were immediately emulsified within the first second of contact with distilled water as dispersion medium and no evidence of phase separation or any instability problem have been observed for at least 72 h. The droplet diameter of dispersed self-emulsifying compositions has been evaluated by Dynamic Light Scattering device. We concluded that the increased Transcutol HP concentrations lead to an obvious improvement in the optical clarity, which correlates with the determined particle size of the corresponding dispersion. In cytotoxicity test the toxic properties of the applied tensides have not been found as additive parameter. The most toxic component determined the cytotoxicity of the SMEDDS.

Our results might ensure useful data for formulation of suitable SMEDDS with lower active ingredient necessity. Developed SMEDDS might be advantageous in terms of increased bioavailability, minimized side effect, and hence the patient compliance.

Keywords: Sedds, Smedds, Cremophor, Labrasol, Transcutol, Caco-2, Hela.

Összefoglalás

Az új hatóanyagok és farmakonjelöltek száma az intenzív farmakológiai kutatások sikerességének köszönhetően az elmúlt években a sokszorosára emelkedett. Ugyanakkor a klasszikus farmakológiai lehetőségek köre egyre szűkül, így rendkívül nagy szükség van olyan innovatív gyógyszerformák létrehozására, amivel a kívánt terápiás előnyök elérhetővé válnak [1]. Az új fejlesztésű hatóanyagok jelentős része a Biofarmáciai Osztályozási rend alapján a III. illetve IV. osztályba sorolható gyógyszeranyag. A farmakon megfelelő feldolgozása mellett ügyelnünk kell a hatóanyag megfelelő biohasznosulására is [2]. A gyógyszer technológiai formulálás során felhasznált biofarmáciai szemlélet nagymértékben hozzájárul olyan gyógyszerformák megtervezéséhez, amelyek a korábban megismert hatóanyag tulajdonságait kedvezően befolyásolják [3]. Számos gyógyszer technológiai lehetőség kínálkozik a nehezen formulálható hatóanyagok szerkezetbe juttatásának optimalizálására [4]. A vízben nehezen vagy egyáltalán nem oldódó gyógyszeranyagok gasztrointesztinális rendszerbe történő juttatásának előnyös megoldása lehet, különböző önemulgeáló illetve ön-mikroemulgeáló rendszer (SEDDS, SMEDDS) készítése [5]. Ezen S(M)EDDS-ek lehetőséget nyújtanak olyan, a BCS IV. osztályába tartozó farmakonok per os adására, melyeket korábban csak parenterálisan tudtunk biztonságosan a szerkezetbe juttatni [6]. Mint a legtöbb orálisan alkalmazott hatóanyag leadó rendszer, a különböző lipid alapú összetételek (lipid-based drug delivery systems LBDDS) is, biohasznosulást növelő képességüket különböző mechanizmusokon keresztül képesek kifejteni [7]. A rendszerek a disszolúciós lépés megkerülésével a hatóanyagokat „elő-oldott” (pre-dissolved) állapotba vihetik, emellett csökkenthetik ezen hatóanyag újbóli kiválását [8]. A P-gp vagy más efflux transzporter mechanizmusok befolyásolásával a hatóanyag permeabilitása tovább javítható.

A gasztrointesztinális traktusból történő hatóanyag felszívódás fokozása kiemelkedően fontos feladat. Azonban érdemes megvizsgálni ezen hatóanyag leadó rendszerek biohasznosulást javító képességét más beviteli mód és terápiás módszer esetén is. Például a nőgyógyászati kezelések meghatározó részénél a lokálisan alkalmazott terápia a mai napig kiemelt jelentőségű [9]. A gyógyszeres kezelés eredményességét ebben az esetben is kedvezőtlenül befolyásolja a felszívódási elégtelenség miatt szükségszerűen magas hatóanyag mennyiség [10]. A kísérletes munka során előállított ön-mikroemulgeálódásra képes rendszerek lehetőséget nyújthatnak a kezelés eredményességének javítására külsőleges felhasználás esetén is.

Kulcsszavak: Sedds, Smedds, Cremophor, Labrasol, Transcutol, Caco-2, Hela.

Bevezetés

A farmakonok alkalmazhatóságának és hatásosságának optimalizálásáért alkalmazott önemulgeálódásra képes összetételek sajátsága, az igen magas tenzid és kotenzid koncentráció [13]. Az önemulgeáló összetételek vizet nem tartalmaznak, csak olajból és tenzidekből álló izotróp keverékek. Ezen rendszerekből vizes közegbe kerülve minimális energia befektetés hatására, nagy diszperzitásfokú o/v típusú mikroemulzió képződik [14]. A kis részecskeméretű diszperz rendszer kialakításához elegendő energiát szolgáltat per os bevétel esetén például a gasztrointesztinális traktus motilitása is [15]. A hatóanyagok olaj/víz megoszlási koefficiense és a kialakult cseppméret módosíthatja a farmakonok felszabadulását [16]. A vizes közegbe kerülés után a cseppméretet elsődlegesen az alkalmazott tenzid természete és koncentrációja határozza meg. Egy olaj/nemionos tenzid/hatóanyag fázisdiagramot megszerkesztve meghatározható az az összetétel, ahol az önemulgeálódás maximálisan végbe megy [17]. Mindezek alapján kijelenthető, hogy a megfelelő önemulgeáló közeg kiválasztásához szükséges megállapítani a hatóanyag szolubilizációját a különböző komponensekben, az önemulgeáló régió területét a fázisdiagramon, valamint az önemulgeálódást követően létrejött cseppek méretét. Az önemulgeáló rendszerek alkalmazása a nehezen oldódó hatóanyagok gyógyszerformában való alkalmazása mellett, lehetőséget nyújthat a bél lumenéből rosszul permeáló hatóanyagok magasabb biohasznosulásának elérésére [16]. Mivel az önemulgeáló rendszerek képzéséhez felhasznált PEG monoészterek önmagukban is képesek befolyásolni a biológiai barrierék funkcióit [18]. Vízben rosszul oldódó hatóanyagok formulálása során széles körűen és nagy mennyiségben alkalmaznak a PEG monoésztereken kívül más szerkezeti struktúrájú felületaktív anyagokat is. Az ilyen rendszerekkel történő terápia biztonságos alkalmazhatóságához ezen tenzidek biológiai hatásvizsgálata részletes elemzésre szorul [19]. A PEG monoészter struktúrájú Cremophor® vegyületek mellett fontos megvizsgálni az önállóan illetve segédemulgensként használt Labrasol® -t, mely szerkezetét tekintve mono-, di- és trigliceridek polietilén glikol mono- és diésztereinek definiált keveréke, valamint a koemulgensként széles körben alkalmazott azonos segédanyag családba tartozó különböző propilén glikol származékokat is. A komponensek vizsgálatával részletes információhoz juthatunk egy-egy gyógyszer technológiai szempontból összeállított

rendszer biológiai hatásáról, illetve a gyógyszerhordozóban lévő hatóanyag biohasznosulásáról [20]. A bélhámsejteken végzett vizsgálatok hozzásegítenek a megfelelő technológiai sajátságok eléréséhez mellett jobban tolerálható gyógyszerforma kialakításához [21]. A cervikális sejtvonalon végzett kísérletek eredményei információt szolgáltathatnak az önemulgeáló rendszerek helyi alkalmazásának lehetőségéről, valamint előnyeiről. Amennyiben a rendszer ártalmatlansága bizonyítható, akkor segítségével az akár szükségszerűen magas terápiás dózisban adagolt hatóanyag mennyisége csökkenthető [22]. Ezáltal a kedvezőtlen mellékhatások gyakorisága illetve súlyossága minimalizálható.

Kísérleti rész

A kísérletsorozatot megalapozó korábbi kísérletek

Elvégzett kísérleteinkben vizsgáltuk több amfifil tenzidcsoport (összesen 16 felületaktív anyag típus) Caco-2 humán adenocarcinoma eredetű bélhámsejtekre, HeLa cervix carcinoma sejtekre valamint humán erythrocytákra gyakorolt hatását különböző citotoxicitási tesztek (MTT, LDH, hemolízis teszt) segítségével. Ez alapján meghatároztuk a S(M)EDDS formuláláshoz felhasználásra kerülő tenzidek IC₅₀ valamint HC₅₀ értékeit. A magasabb IC₅₀ értékekkel jellemzett tenzidek paracelluláris transzportra gyakorolt hatásának mérésével adatokat kaptunk a felszívódás fokozó tulajdonságról. Emellett két diszpenzeres Sigma 700 típusú tenziométer segítségével megmértük az anyagok felületi feszültség módosító képessége alapján, a tenzidek kritikus micella képzési koncentrációját. Mivel a tenzidek szolubilizáló képessége függ azok CMC értékétől, a kémiai szerkezetétől valamint a sejtek életképességére gyakorolt hatásuktól, ezért ezen adatok meghatározása után, összefüggéseket állapítottunk meg [23]. Ezen adatok ismeretében lehetőségünk volt olyan tenzideket kiválasztani, melyekből ezen szempontok alapján megfelelő hatóanyag leadó rendszerek formulálhatók.

Kísérlethez felhasznált anyagok

Az Izopropil mirisztátot a Merck Hungary Kft.-től vásároltuk. A tenzidként felhasznált Labrasol, Lauroglycol FCC, Lauroglicol 90, Capryol 90 Capryol PGMC, Transcutol HP a Gattefossé Franciaország Kft. termékmintái. A Cremophor RH 40 (Kolliphor RH40) a BASF Németország Kft.-től került beszerzésre.

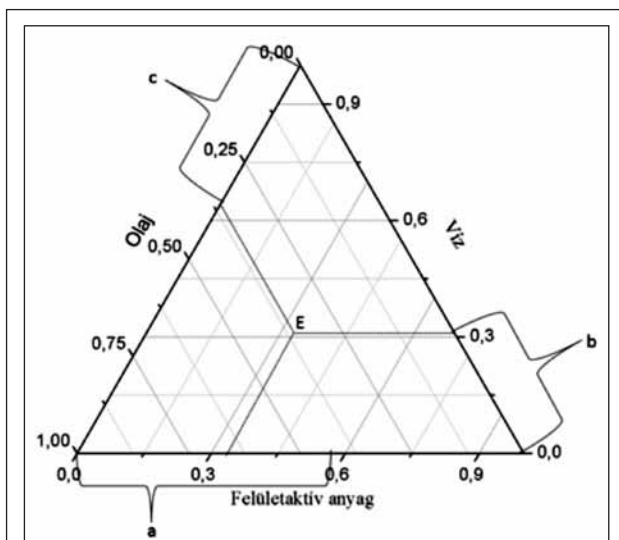
Terner rendszerek jelentősége a formulálás során

Az önemulgeáló rendszerek alkotóinak jellemzésére használt háromszög diagramokban a komponensek egymásban való kölcsönös oldhatósága eltérő [14]. Minden terner rendszer fázisdiagramján a háromszög csúcspontjai közül kettő a tiszta víz, illetve olaj komponenst jelöli [24]. A harmadik csúchoz a formulálása során választott tenzid monokomponens vagy keverék rendelhető. Minden ilyen háromfázisú rendszernél megállapíthatóak olyan nyomás vagy hőmérséklet értékek, amelynél két összetevő csak részben vagy egyáltalán nem elegyedik [25]. A harmadik komponensként használt felületaktív anyag jelenléte (mivel az részben elegyedik mindkét másik komponenssel) megváltoztatja a két részben elegyedő komponens kölcsönös oldhatóságát. Önemulgeáló rendszerek képződésekor jelentős kémiai reakció nem játszódik le, így a rendszerek állapotának jellemzéséhez a hőmérsékleten és nyomáson kívül az összetételre van szükség. Két komponens móltörtjének ismeretében a harmadik komponens móltörtje kiszámítható, a szabadsági fokok száma egy ilyen összetételben négy [26].

Adott körülmények között ennek megfelelően a rendszer állapotát a két összetétel adat egyértelműen meghatározza. Ahhoz, hogy egy terner rendszer fázisdiagramját síkban ábrázolhassuk, két paramétert – célszerűen a nyomást és hőmérsékletet – állandónak kell vennünk. Ez esetben a három komponens által meghatározott összetételt egyenlő oldalú háromszögben ábrázoljuk. A háromszög oldalain az alkotó komponensek tömegszázalékát tüntetjük fel. A háromszög diagram körüljárási iránya tetszőlegesen megválasztható, vizsgálatainknál az óramutató járásával ellentétes irányt választottuk. A háromszög belsejében tetszőlegesen kiválasztott E (mint elegy) pont összetételét úgy kapjuk meg, ha a ponton keresztül az oldalakkal párhuzamos egyeneseket rajzolunk és az egyes komponensek tömegszázalékait a megfelelő oldalakon leolvassuk [27]. A diagram egy-egy oldala a folyadékpáronkénti kétkomponensű rendszerek összetételét adja meg (1. ábra).

Hatóanyag leadó rendszerek képzése Terner rendszerek alkalmazásával

Az önemulgeáló rendszerek képzését, számítógép vezérelt kapcsolt Schott Titronic® 200 automata diszpenzerekkel végeztük. A Gibbs-féle fázisszábályt alkalmazva a három komponensűnek tekintett



1. ábra: Terner rendszer összetételének meghatározása háromszögdiagramon. Az egyes komponensek tömegszázalék arányai az óramutató járásával ellenkező irányban nőnek

rendszert négy állapotjelző megadásával: a hőmérséklet, a nyomás és két komponens móltörtjének értékeivel jellemeztük és a Terner rendszerben háromszög diagramon ábrázoljuk. A kísérletsorozatban vizsgálni kívánt két összetevő minden esetben egy vizes közeg és olajos fázisként izopropyl mirisztát volt, amihez hozzárendeltük a kiválasztott tenzidet vagy tenzid keveréket. A terner rendszerek segítségével Cartesian/Descartes-féle koordinátaszámítással megállapítottuk az összetételek homogén heterogén vagy konjugált fázis összetételeit, valamint a rendszerek kritikus keveredési pontját. A homogén fázisösszetételek tulajdonképpen az ön-emulgeálódásra, illetve a diszpergált olajcseppek méretétől függően ön-mikroemulgeálódásra képes rendszerek.

A diszpergált fázis méreteloszlásának vizsgálata dinamikus fényszórás mérés segítségével

A dinamikus fényszórás fotometria (DLS) gyors mérési lehetőség a diszpergált olajcseppek számos fontos paraméterének a meghatározásához. A vizsgálatok során a megvilágított diszpergált részecskék által szórt fény analízise történik. A heterogén diszperz rendszer vizsgálata tulajdonképpen a szórt fény időbeli változásának követése, autokorrelációs függvényének felvétele és analízise mellett. A részecskék méreteloszlásának meghatározásához Brookhaven Fotométert használtunk. Az emulziós rendszerek vizsgálatát 60° – 155°-os szórési szögeknél végeztük. Minden szög-nél három korrelációs függvényt vettünk fel. A mérési időtartam minden esetben 300 s volt.

Sejtenyésztés

Az önemulgeálódásra képes hatóanyagleadó rendszerek élő sejtekre gyakorolt hatását a monolayer kialakítására képes Caco-2 (human Causcasian Colon adenocarcinoma) valamint HeLa cervicalis carcinoma sejteken vizsgáltuk [28]. A kísérletekhez használt Caco-2 valamint HeLa sejt vonalat az ECACC (European Collection of Cell Cultures, Egyesült Királyság) sejtbankon keresztül szereztük be. A sejteket letapadó sejt kultúrához alkalmas sejtenyésztő edényben (Nunc; Dánia), 10(v/v)% inaktivált főtális szarvasmarha szérumot (FBS, Sigma-Aldrich; Magyarország), 1(v/v)% nem esszenciális aminosavat (Sigma-Aldrich; Magyarország) és 100 mg/ml gentamicint tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich; Magyarország) tenyésztő médium folyadékban növesztettük CO₂ termosztátban (5% CO₂ atmoszférában) 37 °C-on 95% páratartalom mellett. A sejteken a tápoldat cserét minden 3. napon végeztük. A sejtek passzálásához 0,05 m/v% tripszin 0,02 m/v % EDTA- oldatot [0,5 % g/l tripszin (Sigma-Aldrich; Magyarország); 0,2 g/l EDTA (Sigma-Aldrich; Magyarország)] használtunk. A vizsgálathoz 22-45 passzázs szám közötti sejteket használtunk [9].

Sejt-életképességi vizsgálatok

MTT teszt

Az MTT teszt során az életképes sejtek mitokondriumai a sárga színű 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromidot (MTT) lila színű vízben oldhatatlan formázán kristályokká képesek átalakítani [29]. A vizsgálathoz a Caco-2 sejteket 7 napig, a HeLa sejteket 4 napig az előző pontban ismertetett módszerrel, 96 lyukú tenyésztő plate-ben (10⁴ sejt/lyuk) növesztettük. A növesztés során a 3. napon a médiumot lecseréltük. A konfluens sejtréteg kialakulását köve-

tően különböző koncentrációjú, PBS-ben készült tenzid oldatot pipettáztunk a sejtekre. 30 perces inkubálás után, PBS-el készült 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatra cseréltük a vizsgálati mintákat. Majd 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáltuk. A felülúszó eltávolítása után a keletkezett formázán kristályokat 150 µl sósavas 2-propanollal (2-propanol:sósav = 25:1) oldottuk fel. Az oldatok abszorbanciáját FLUOstar Optima Microplate Reader (BMG LABTECH, Németország) segítségével 570 nm-en mértük. Korrigálásként kivontuk az 570 nm-en mért abszorbancia értékekből a sejt törmelék szuszpenzió, mint háttér 690 nm-en mért abszorbancia értékeit. A kísérlet során át nem alakult (feltételezhetően a sejt törmelékhez tapadó) festék nem befolyásolta a meghatározást, tekintettel arra, hogy a redukálatlan MTT-nek nincs elnyelése 570 nm-en. Az így kapott eredményeket, a kezeletlen kontroll minták abszorbancia értékeihez viszonyítva százalékban fejeztük ki és a tenzid koncentráció függvényében ábrázoltuk [13]. A grafikonok segítségével meghatároztuk az egyes felületaktív anyagokra jellemző IC₅₀ (az a tenzid koncentráció, amelynél az életképes sejtek aránya 50%) értékeket.

Eredmények

Hatóanyag leadó rendszerek képzése Terner rendszerek alkalmazásával

A formulálás során megállapítottuk, hogy a korábban vizsgált felületaktív anyagok közül az önemulgeáló rendszerek képzéséhez a Labrasol, a Transcutol HP valamint a Cremophor RH40 bizonyult megfelelőnek. Ezeket Terner diagramban ábrázolva kiválasztottuk az önmikroemulgeáló rendszerek képzésére legalkalmasabb összetételeket (1. táblázat). A rendszerek 1 ml-es mennyiségében 1 ml izopropil mirisztátot kevertünk, majd az így kapott rendszert desztillált vízzel hígítva vizsgáltuk a képződő emulziós összetételeket. A vizs-

I. táblázat

A kiválasztott ön-mikroemulgeáló rendszerek képzésére legalkalmasabb összetételek

	Cremophor RH40	Transcutol HP	Labrasol
Összetétel 1	33%	33%	33%
Összetétel 2	25%	50%	25%
Összetétel 3	20%	60%	20%
Összetétel 4	20%	40%	40%
Összetétel 5	16%	32%	52%
Összetétel 6	16%	52%	32%

II. táblázat

A diszpergált olajcseppek mérete DLS mérés alapján

Összetétel	A diszpergált cseppek átlagos mérete	Az értékek közt számított szórás (\pm SD)
Összetétel 1	171,6 nm	$\pm 2,82863$
Összetétel 2	69,2 nm	$\pm 4,76334$
Összetétel 3	78,4 nm	$\pm 4,521$

gálat eredményeit pszeidoterner diagramban ábrázoltuk (2. ábra). A pszeidoterner diagramok eredményei alapján a terápiás rendszerként legelőnyösebbek a legnagyobb mikroemulzió képzési „front”-tal (maximum microemulsion existing zone) rendelkező 1., 2., valamint 3. (Összetétel 1, Összetétel 2, Összetétel 3) összetételek. Ezek közül is az 1:3:1 arányú Cremophor RH40 Transcutol HP Labrasol keverék a leginkább megfelelő igaz az

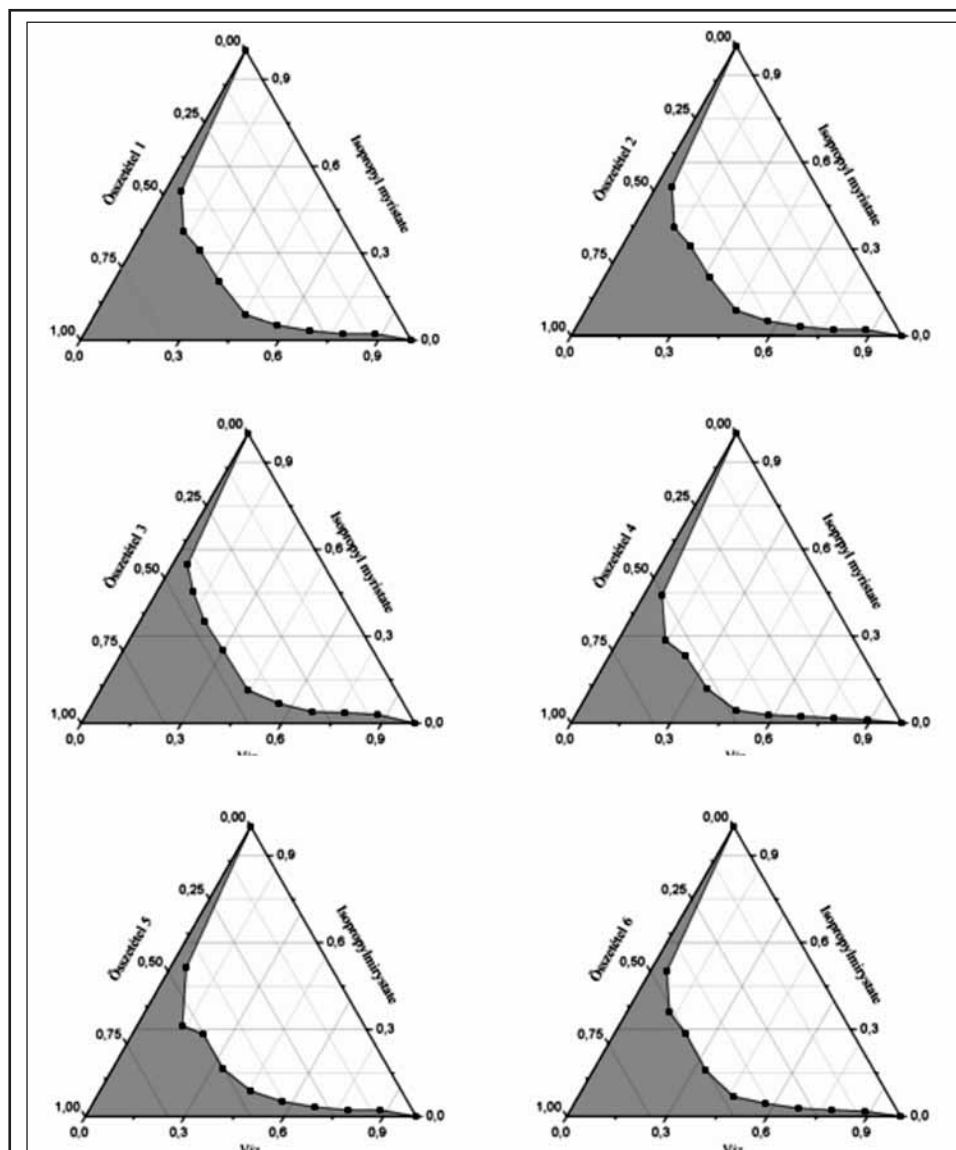
olajkomponenshez viszonyított Transcutol HP arány is itt a legmagasabb. A rendszereket ezt követően VIII. magyar gyógyszerkönyvi stabilitási vizsgálatoknak vetettük alá [30]. A tenzid összetételek 6 hónap eltartás során sem mutattak változást [31]. A rendszerek mindegyikébe 1 ml izopropil mirisztátot keverve, majd az így kapott rendszert desztillált vízzel kétszázszorosára hígítva kapott áttetsző vagy transzluens heterogén diszperz rendszerek 1 hónap alatt nem mutattak a szétválás jeleit.

*A diszpergált fázis
méreteloszlásának
vizsgálata az önemulgeáló
rendszerekben*

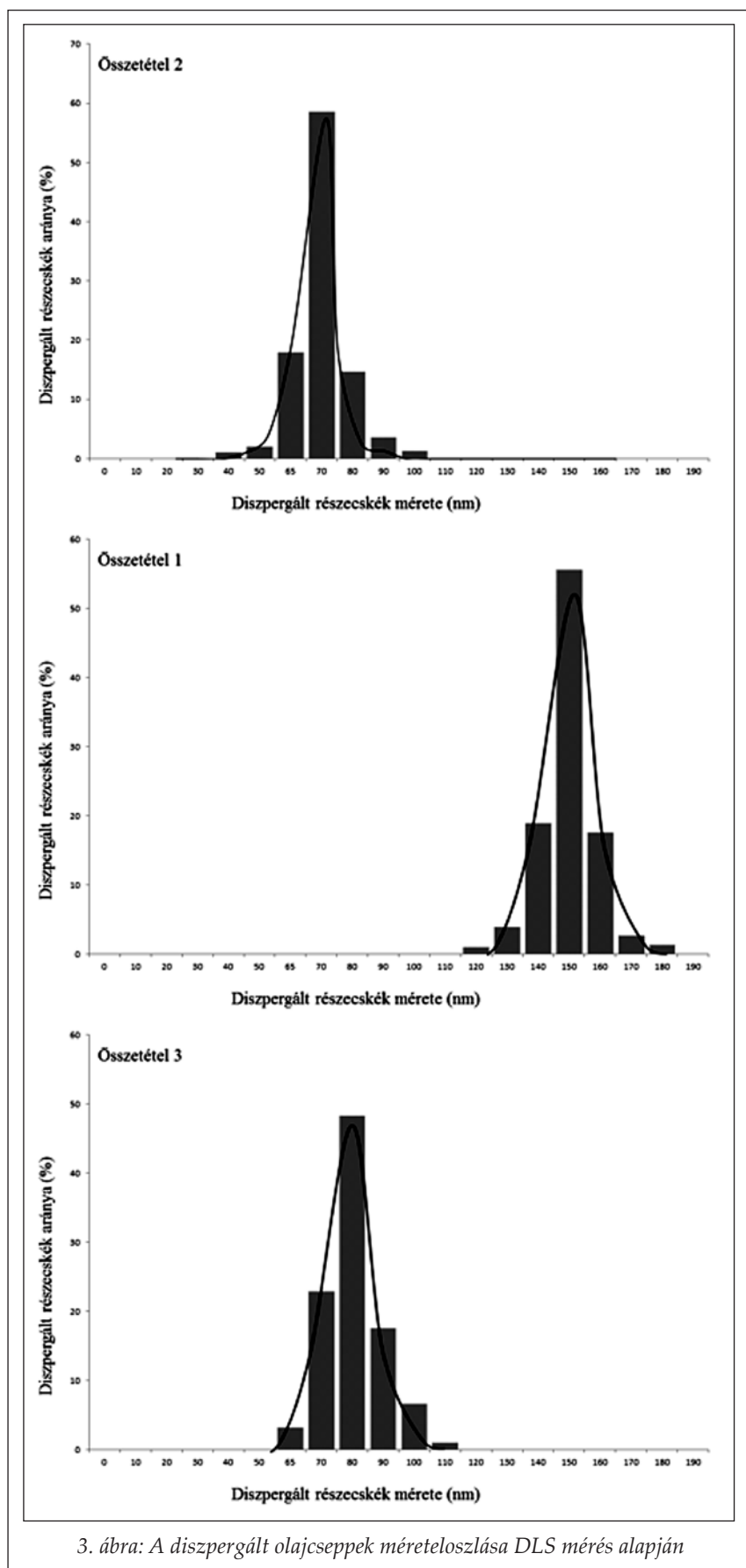
Az összetételekből fent leírt módon képzett emulziós heterogén rendszerekben a diszpergált olajcseppek mérete DLS mérés alapján 171,6 és 69,2 nm között voltak (II. táblázat, 3. ábra). Az eredmények megfelelnek a mikroemulzió képződés feltételeinek. [32]

*A citotoxicitási vizsgálata
eredményei*

A rendszerek vizsgálata során megállapítható, hogy azok a fiziológiai kihígulásnak megfelelő koncentrációban nem okozták a sejtek életképességének megváltozását. Ez a tulajdonság azonban a koncentráció emelésével változik. A kapott toxicitási értékek sorrendi-



2. ábra: Az összetételekből képződő emulziós rendszerek pszeidoterner diagramjai.
Az árnyékolt terület az ön-mikroemulgeálódásra képes összetételeket jelöli



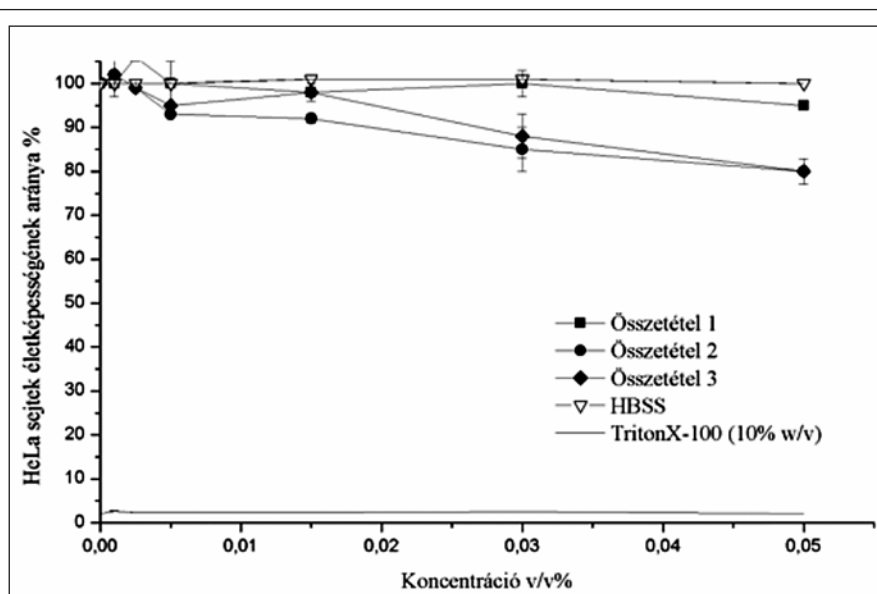
sége azonos Caco-2 valamint HeLa sejtvonalak esetében. A tenzid keverékek toxicitása koncentrációfüggő, ugyanakkor nem additív tulajdonságként jelentkezett [33]. Az alkotó tenzidek sejtelétképességre gyakorolt hatását a munkacsoportunk által végzett korábbi kísérletekben megvizsgáltuk [24]. Az eredményeket összehasonlítva elmondható, hogy a rendszerek toxikus karaktere az alkotó komponensek közül a legtoxikusabb tenzid sejtkárosító képességének mértékével megegyezik. (4. és 5. ábra).

Statisztikai analízis

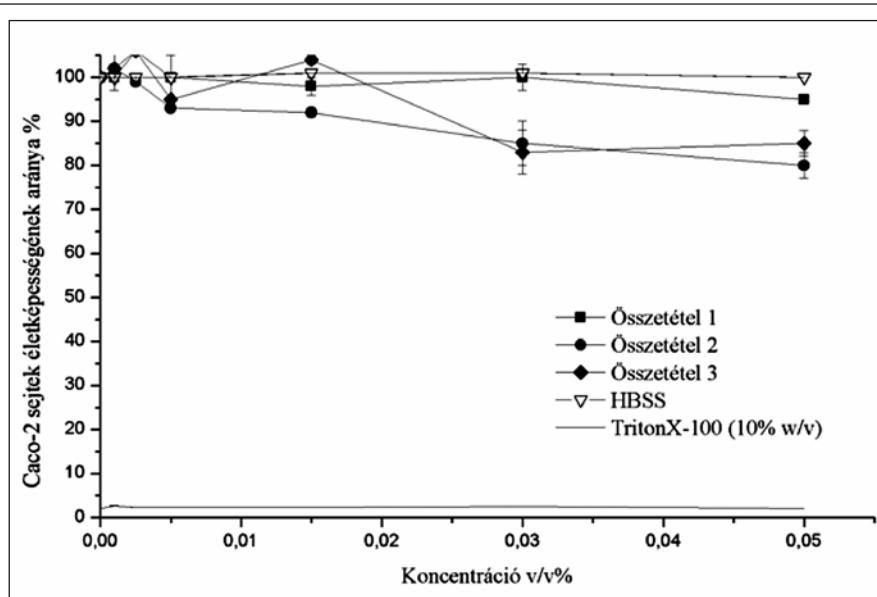
A mérések során kapott eredményeinket statisztikailag a SigmaStat (version 3.1; SPSS, Inc.) segítségével elemeztük. Az eredményeink között ez alapján számított átlagukat tüntettük fel \pm SD. A csoportok összehasonlítását ONE WAY ANOVA módszerrel végeztük, amelyet Tukey's teszt követett. A kísérleti eredményeinket legalább 3 párhuzamos mérés szolgáltatotta, a különbségeket $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Következtetések

Kísérletsorozatunkban különböző kémiai szerkezetű és HLB értékkel jellemezhető tenzidekből önmulgeálódásra képes hatóanyagleadó rendszereket képeztünk. A kutatócsoport által korábban elvégzett kísérleteinkben a formulációhoz felhasználni kívánt tenzid csoportokból, azok sejtelétképességre gyakorolt hatása alapján, a Labrasolt, a Transcutol HP-t, valamint Cremophor RH40-t választottuk ki az önmulgeáló rendszerek készítéséhez. A sejtkárosító hatás megállapítására a mitokondriális aktivitásváltozást illetve az



4. ábra: Az 1., 2. valamint 3. összetétel hígításainak HeLa sejtek életképességre gyakorolt hatása MTT teszt segítségével vizsgálva ($p < 0,05$)



5. ábra: Az 1., 2. valamint 3. összetétel hígításainak Caco-2 sejtek életképességre gyakorolt hatása MTT teszt segítségével vizsgálva ($p < 0,05$)

keveréket képezve a sejtkárosító hatás egy-egy komponensre jellemző vagy aditív tulajdonság. Az ön-emulgeáló rendszerek képzését automata diszpenzerek segítségével olaj illetve víz dilúciós módszerrel végeztük. A kiválasztott tenzidek különböző arányú keverékét pszeudoterner diagramban vizsgálva megállapítottuk, hogy hat összetételben a mikroemulzió képződése jelentős hígulás mellett is kifejezett. A pszeudoterner diagramok eredményei alapján a terápiás rendszerként legelőnyösebbek a legnagyobb mikroemulzió képzési „front”-tal (maximum microemulsion existing zone) rendelkező 1., 2., valamint 3. (Összetétel 1, Összetétel 2, Összetétel 3) összetételek. Ezek közül is az 1:3:1 arányú Cremophor RH40 Transcutol HP Labrasol keverék a leginkább megfelelő [35].

Dinamikus fényszóráson alapuló részecskeméret meghatározás során megállapítottuk, hogy ezen előnyösnek talált összetételek 200 szoros hígításaiban az eloszlatott diszperz fázisú olajcseppek mérettartománya a 69-172 nm-es intervallumban vannak. Ez a mérettartomány megfelelő a célként kitűzött biohasznosulást növelő

extracelluláris LDH aktivitásváltozást mértük [34]. A kiválasztott felületaktív anyagok hidrofíl alkotójukban és a zsírsav komponenseik szénatom számában is különböztek. A Labrasol esetében pedig a molekula észterezettségi foka is eltérő. Korábbi eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a felületaktív anyagok koncentrációfüggően képesek befolyásolni az élő sejtek arányát Caco-2 sejtvonalon végzett *in vitro* kísérletekben [23].

Munkánk során megvizsgáltuk, hogy ezen ismert toxikus karakterrel jellemezhető tenzidekből

velő összetétel kialakításához. A kialakított ön-emulgeálódo rendszerek alkalmazhatóságát meghatározza az összetételek stabilitása. Ennek biztosítására stabilitási teszteket végeztünk a vízmentes összetételekkel illetve a képződött mikroemulziós rendszerekkel egyaránt. Vizsgálataink során a tenzid összetételek hat hónap során nem mutattak elváltozást. Az olaj komponenszt tartalmazó rendszereket kétszázszorosára hígítva létrejött áttetsző vagy transzluens heterogén diszperz rendszerek 1 hónap alatt nem mutatták a szétválás jeleit.

Kísérletsorozatunk tervezésekor célul tűztük ki a tenzid keverékek élő szervezetre gyakorolt hatásának vizsgálatát. A gyógyszer technológiailag megfelelőnek talált összetételeket MTT sejtelképességi vizsgálat segítségével karakterizáltuk. A kísérleteket HeLa illetve Caco-2 sejtvonalon elvégezve a felületaktív anyagok toxikus tulajdonságát nem találtuk additív jellemzőnek. Ezen eredményeket az összetételek paracelluláris transzportra gyakorolt hatásának vizsgálatával kiegészítve hasznos adatokat szolgálhatnak a hatóanyagleadó rendszerek az *in vitro* valamint *in vivo* körülmények közötti viselkedésének megismeréséhez [36].

Kutatási eredményeink újabb igazolásul szolgálnak a gyógyszer technológiai segédanyagok széleskörű vizsgálatának szükségességéhez. A kialakított gyógyszerformák technológiai megfelelősége alapvető, de nem elegendő feltétele a sikeres gyógyszeres terápiának. A biofarmácia szemlélet elengedhetetlen az új innovatív gyógyszerek kialakításához. Hiszen csak az ilyen szemlélettel kifejlesztett készítmények képesek az optimális gyógyszerhatás elérése céljából csökkenteni a szervezetbe juttatott hatóanyag mennyiségét, elkerülve a nem kívánatos mellékhatásokat, és a terápiás igényeknek megfelelően, a hatóanyag-fel szabadulását, tervezett módon, a megfelelő helyen és időben, meghatározott sebességgel biztosítani.

Támogatás

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

IRODALOM

- Kasim, N.A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennernäs, H., Hussain, A.S., Junginger, H.E., Stavchansky, S.A., Midha, K.K., Shah, V.P., Amidon G.L.: *Mol. Pharm.*, 1, 85-96 (2004).
- Dévay, A. Antal, I.: *A gyógyszeres terápia biofarmáciai alapjai. Medicina*, Budapest 43-52. (2009).
- Yang, A.D., Bauer, T.W., Camp, E.R., Somcio, R., Liu, W., Fan, F., Ellis, L.M., Qiao, L., Zhang, Q., Yan, H., Liu, K.: *Cancer*, 103, 1561-1570 (2005).
- Au, J.L.: *J. Control. Release*, 74, 31-46 (2001).
- Zhu, J.X., Tang, D., Feng, L., Zheng, Z.G., Wang, R.S., Wu, A.G., Duan, T.T., He B., Zhu, Q.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39(3) 499-506 (2013).
- Sagitani, H., Friberg, S.E.: *J. Disper. Sci. Technol.* 1(2), 151-164 (1980).
- Porter, C.J. et al.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 231-248 (2007).
- Huiling, M., René Holma, B., Anette, M.: *Int J Pharm* 453, 215-224 (2013).
- Gerd, J., Bauerschmitz A., K., Minghui W., Isabell H., Denise R. Shaw., Theresa V. Strong, Renee Desmond, Daniel T. Rein, Peter Dall, David T. Curiel, Akseli Hemminki: *Int J Cancer* 111(2), 303-309 (2004).
- Bodner K, Bodner-Adler B, Wierrani F, Kubin A, Szölts-Szölts J, Spängler B, Grünberger W.: *Anticancer Research* 23(2C), 1785-1788 (2003).
- Ujhelyi, Z., Fenyvesi F, Váradi J, Fehér P, Kiss T, Veszelka S, Deli MA, Vecsernyés M, Bácskay I.: *Eur J Pharm Sci* 47, 564-573 (2012).
- Pouton, C.W.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 29, 278-287 (2006).
- Colombo, D.: *Int J Immunopath Pharmacol* 203(4), 1177-1183 (2010).
- Pouton, C.W.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 11(Suppl. 2), 93-98 (2000).
- Gao, P., Rush B.D., Pfund W.P., Huang T., Bauer J.M., Morozowich W., Kuo M.S., Hageman M.J.: *J. Pharm. Sci.*, 92, 2386-2398 (2003).
- Sagar S.R., Anderson B.D.: *Adv Drug Deliv Rev* 60, 638-656 (2008).
- Sujoy P., Amiya K.J.: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 419, 113-124 (2013).
- Wang C.H. Qiao L., Zhang Q., Yan H., Liu K.: *Int. J. Pharm* 430(1-2), 372-380 (2012).
- Menard, N. Tsapis N., Poirier C., Arnaud T., Moine L., Lefoulon F., Péan J.M., Fattal E.: *Int. J. Pharm* 28, 423(2) 312-20 (2012).
- Gursoy, N., Garrigue, J.S., Razafindratsita, A., Lambert, G., Benita, S.: *J. Pharm. Sci.* 92, 2411-2418 (2003).
- Fischer, S.M., Brandl, M., Fricker, G.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79, 416-422 (2011).
- Eckert L.O, Lentz G.M.: *Infections of the lower genital tract: Vulva, vagina, cervix, toxic shock syndrome, HIV infections.* In: Katz VL, Lentz GM, Lobo RA, Gershenson DM, eds. *Comprehensive Gynecology.* (5) 2. (2007)
- Lalikoglu, M., Bilgin M.: *Fluid Phase Equilibria* 371, 50-56 (2014).
- Altena F.W., Smolders C.A.: *Calculation of Liquid-Liquid Phase Separation in a Ternary System of a Polymer in a Mixture of a Solvent and a Nonsolvent Macromolecules*, 15, 1491-1497 (1982).
- Espinosa, G.P., Scanlon M.G.: *Res Intern* 53(1), 49-55 (2013).
- Atkins P.W.: *Physical Chemistry for the Life Sciences.* W H Freeman & Co, 448-451. (2005)
- Bigansoli, E., Cavenaghi, L.A., Rossi, R., Brunati, M.C., Nolli, M.L.: *Farmaco* 54, 594-599 (1999).
- Mosmann, T.: *J. Immunol. Method.* 65(1-2), 55-63. 572 (1983)
- Magyar Gyógyszerkönyv VIII. kiadás Országos Gyógyszerészeti Intézet, Budapest 2653-2660. (2008)
- Jones, David: *Pharmaceutics - Dosage Form and Design* 1th edition, Pharmaceutical Press 274-279. (2008)
- Sjöblom, J.: *Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology*, Marcel Dekker Inc., (2001)
- Palamakula, A., Khan, M.A.: *Int J Pharm.* 273(1-2), 63-73 (2004).
- Sha, X., Yan, G., Wu, Y., Li, J., Fang, X.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 24, 477-486 (2005).
- Zhang P, Liu Y, Feng N, Xu J.: *Int J Pharm* 355(1-2), 269-76 (2008).
- Fotakis, G., Timbrell, J.A.: *Toxicol. Lett.* 160, 171-177 (2006).

A nyers heretej gesztagén hatásainak vizsgálata patkányban

SERES ADRIENN, DUCZA ESZTER, GÁSPÁR RÓBERT*

Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet, Szeged, Eötvös u. 6, 6720

*Levelezési cím: gaspar@pharm.u-szeged.hu

Summary

Seres, A., Ducza, E., Gáspár, R.: *Investigation of gestagenic effect of raw drone milk in rats*

Numerous honeybee products are used in traditional medicine. The best-known honeybee products are the honey, the propolis and the royal jelly. Drone milk is a relatively little-known honeybee product. Although, drone milk is traditionally used to treat infertility and to promote vitality in both men and women in certain countries, the literature furnishes no information concerning effects of the drone milk. The oestrogenic and androgenic effects of drone milk have recently been reported in rats and the effective compounds have also been identified.

The aim of this study was to determine the putative gestagenic effect of raw drone milk in rats.

Maintenance of pregnancy assays revealed that drone milk was able to increase the number of surviving fetuses. This results suggested some gestagenic effects. This effect was confirmed by RT-PCR and Western blot methods in which the mRNA and protein expressions of gestagen-dependent CRLR (Calcitonin Receptor-Like Receptor) peptide were determined. To determine the efficacy of gestagenic effect of drone milk, spironolactone (weak gestagen compound) was used. The combination of drone milk and spironolactone showed more potent gestagenic effect.

These results lead us to suppose that raw drone milk shows weak gestagenic effect and this effect can be increased by another weak gestagen. Further studies are required to clarify the gestagenic mechanisms of action of drone milk.

Összefoglalás

A népgyógyászatban, ill. a gyógyszeres terápia kiegészítéseként számos méhészeti terméket alkalmaznak. Közülük legismertebbek a méz, a propolisz és a méhpempő. Kevésbé ismert a heretej – az angolszász szakirodalomban hatása egyáltalán nem ismert –, melyet a népi gyógyászatban termékenység fokozására, ill. általános roboráló szerként használnak. Korábbi vizsgálatainkban már igazoltuk, hogy a heretej ösztrogén, ill. androgén hatással rendelkezik és bioaktivitást kereső fracionálásokat követően a hatásért felelős komponensek izolálása is megtörtént.

Jelen kísérleteinkben célul tűztük ki a nyers heretej gesztagénszerű hatásainak vizsgálatát patkányokban.

Vizsgálatainkban, a vemhességmegtartó teszt alkalmazása során azt tapasztaltuk, hogy a heretej kezelés hatására – gesztagén hatás jelenlétére utalva – a túlélő főtuszok száma megemelkedett. Ezt a hatást molekuláris farmakológiai módszerekkel, RT-PCR és Western blot technikákkal is alátámasztottuk, mely vizsgálatok során az gesztagén-dependens CRLR (Calcitonin Receptor-Like Receptor) fehérje, ill. annak mRNS-ének fokozódását tapasztaltuk heretej kezelést követően. A heretej gesztagén hatásereőségének feltérképezése során a spironolaktonhoz (gyenge gesztagén) hasonlítottuk a hatását. A két vegyület kombinációja során jelentős hatásereősödést tapasztaltunk.

Vizsgálataink alapján a nyers heretej gyenge gesztagén hatással rendelkezik, amely hatása egy másik gyenge gesztagén jelenlétében fokozódik. A pontos hatásmechanizmus feltárása további kísérleteket igényel.

Bevezetés

A méhészeti termékeket széles körben alkalmazzák a népgyógyászatban ill. a gyógyszeres terápia kiegészítésére a klinikumban, sőt még a kozmetikai iparban is. Mivel napjainkban egyre nő az érdeklődés a funkcionális élelmiszerek iránt, melyeknek szerepük lehet a betegségek megelőzésében és kezelésében, így egyre több közlemény születik a különböző méhészeti termékek hatásairól.

Legismertebb közülük a méz, melyről számos igen különböző összetevője (pl.: mono- és oligoszacharidok, flavanoidok, nitrogén-monoxid, enzimek) révén számos farmakológiai hatást leírtak. Egyebek mellett rendelkezik különböző hatásmechanizmusokkal is alátámasztható antidiabetikus hatással [1], antimikrobás [2] és gyulladáscsökkentő hatását [3] pedig előszeretettel használják ki a sebgyógyítások területén [4] ill. köhögéscsillapító-

ként [5]. Egyik különleges fajtájáról, a Tualang mézről leírták, hogy ösztrogén hatása révén terápiai értékű lehet posztmenopauzában, sőt megfelelő dózisokban adagolva emelte a progeszteron szérumszintjét is [6].

Jelenleg is igen intenzíven vizsgálnak egy másik méhészeti terméket, a méhpempőt. A méhpempő a dolgozó méhek garatmirigyének a váladéka, a méhkirálynő legfőbb tápláléka. Az már ismert, hogy a méhek táplálkozása összefügg termékenyséjükkel, így a méhkirálynő termékenysége is összefüggésbe hozható a méhpempő fogyasztásával [7]. Számos a méhpempőből izolált zsírsavról (10-hidroxi-transz-2-dekanoátsav és származékai) igazolták különböző sejtvonalakon, hogy kötődik az ösztrogén receptorhoz és hipertrófizálja a patkányok miometriumát [8]. Ezen *in vitro* és *in vivo* eredmények alapján a méhpempő a hormonpótló terápia alternatívája lehet menopauzában [9] és jó-

tékony hatása a különböző fertilitási problémák kezelésében [10].

Kevésbé ismert azonban, hogy a méhkirálynőhöz hasonlóan, a hereméheknek is saját, speciális táplálékuk van, melyet heretejnek neveznek. A heretej viszkózus, sárga színű, enyhén édes folyadék, melynek előállítását, a méhpempőhöz hasonlóan, a dolgozó méhek végzik. A heretej, mint külön méhészeti termék, az angolszász szakirodalomban nem ismert, habár a hereméhek fészekalját Kínában, Oroszországban és Erdélyben a klímax tüneteinek ill. szexuális problémák kezelésére alkalmazzák, mindemellett általános roboráló szerként is jelen van a népi gyógyászatban. Romániában a fagyasztott hereméh fészekaljat például alkalmazzák idős emberek rehabilitására és aktivitásuk fokozására [10]. A hereméhek fészekaljának fő komponense a heretej, de már nem tartalmazza a lárva és a báb fejlődési alakokat. A heretejet a méhészek a mézhez hasonlóan pergetéssel készítik és a hereméh fészekaljhoz hasonló felhasználási területen alkalmazzák a népi gyógyászatban. Mindezen alkalmazási területek valamilyen nemi hormonhatást sejtetnek.

Korábbi vizsgálatainkban igazoltuk, hogy a heretej ösztrogén és androgén hatásokkal rendelkezik, és bioaktivitást kereső frakcionálást követő GC-MS és NMR mérésekkel a hatásért felelős komponensek izolálása is megtörtént [11, 12]. Habár, a méhészeti termékek igen széles körben vizsgált vegyületek, gesztágén hatásairól mindeddig kevés információ áll rendelkezésünkre, így további vizsgálatainkban célul tűztük ki a heretej lehetséges gesztágén hatásainak a feltérképezését.

Anyagok és módszerek

Heretej gyűjtése

A heretejet repcevirágzásakor, késő tavasszal gyűjtötték, Polgár Sándor magán méhészetében készítették el, leválasztva a lárva és báb alakokat. A nyers heretejet műanyag fagyasztócsövekbe szétosztottuk és a kísérletek megkezdéséig -20 °C-on tartottuk.

Állatkísérletek

Az állatkísérleteket a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának és a Csongrád Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyével végeztük (engedélyszám: IV./198/2013.).

Kísérleteinkben ivarérett nőstény Sprague-Dawley nőstény patkányokat használtunk, melyeket a Charles River Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztünk be. Az állatokat szabályozott hőmérsékletű (20-23 °C), páratartalmú (40-60%) és megvilágítású (12 órás periódus) Kísérleti Állattartóban tartottuk, ahol rágcsálóknak való takarmányt és csapvizet kaptak *ad libitum*.

Vemhességmegtartó vizsgálat

160-180 g-os ivarérett nőstény és 220-240 g-os hím Sprague-Dawley patkányokat pároztattunk. A párzás kezdetétől számítva 4-5 óra múlva a nőstény állatok hüvelykenetét mikroszkóp alatt megvizsgáltuk. Amely kenetben hímivarsejtek meglétét igazoltuk, azt a nőstényt, mint 1. napos vemhes állatot elkülönítettük. A vemhességük 8. napján az állatokat izoflurán anesztéziában kétoldali petefészek eltávolításnak vetettük alá, miközben a meglévő főtuszokat (implantációs helyeket) megszámoztuk. A petefészekirtott vemhes nőstényeket 3 csoportba osztottuk, csoportonként legalább 7 vemhes állatot vontuk be a kísérletbe, melyeket a vemhességük 8-14. napján kezeltünk naponta egyszer azonos időpontokban. A pozitív kontroll csoport progeszteront (3 mg/nap) és 17 β -ösztadiol-valerátot (6,6 μ g/kg/nap) kapott szubkután injekció formájában, míg a negatív kontroll csoport csak 17 β -ösztadiol-valerátot (6,6 μ g/kg/nap) kapott. A harmadik csoport heretejet (0,5 g/kg/nap) kapott per os, gyomorszájából keresztül adagolva, valamint 17 β -ösztadiol-valerátot (6,6 μ g/kg/nap) szubkután injekcióban. A további kísérletekben az állatoknak kombinációban adagoltunk per os spironolaktont (20 mg/kg/nap) és heretejet. A vemhesség 15. napján a túlélő főtuszokat megszámoztuk és a kiindulási főtuszok számának százalékában adtuk meg [13, 14].

RT-PCR mérés

Vizsgálatainkban 6 nappal a kezelések kezdete előtt 160-180 g-os ivarérett nőstény Sprague-Dawley patkányok petefészkét izoflurán anesztéziában eltávolítottuk, majd 3 napig, naponta kétszer kezeltük a vizsgálati anyagokkal. A kontroll csoport desztillált vizet, mint vivőanyagot, a pozitív kontroll csoport szubkután progeszteront (2x2 mg/nap), a harmadik csoport pedig per os adagolt heretejet (0,5 g/kg/nap) kapott. A későbbiekben egy gyenge gesztágén hatású vegyület, a spironolaktont (2x15 mg/kg/nap) ill. spironolaktont és here-

tej kombinációjával is kezeltük az állatokat. Az utolsó kezelést követően 24 órával az állatokat mély izoflurán anesztéziában leöltük, a méhszövetet eltávolítottuk. A környező szövetektől, zsírszövetből megtisztítva a mintákat egy éjszakán keresztül 4 °C-on RNAlater oldatban (Life Technologies, Budapest, Magyarország) tároltuk, majd ezt az oldatot eltávolítva a vizsgálat kezdetéig -70 °C-on tartottuk a mintákat.

A mintákból TRIsure reagenssel (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) totál RNS-t izoláltunk, mely mennyiségi és minőségi meghatározása nanotróp technikával (BioSpec Nano, Shimadzu Biotech, Budapest, Magyarország) történt 260-280 nm-en (OD: 1,6-2,0). Első lépésben 1 µg totál RNS-ből kiindulva reverz transzkripció során cDNS-t szintetizáltunk High-capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies, Budapest, Magyarország) felhasználásával. Az RNS mintákat először 60 percig 37 °C-on, majd 5 percig 95 °C-on, végül 5 percig 4 °C-on tartottuk és az így elkészült cDNS-t -20 °C-on tároltuk. A PCR termékek (CRLR, GAPDH) felsokszorozását TaqMan Gene Expression Master Mix-szel (Life Technologies, Budapest, Magyarország) végeztük ABI StepOne Real-Time PCR készülékben (Life Technologies, Budapest, Magyarország). 2 percig 50 °C-on, majd 10 percig 95 °C-on, végül 40 cikluson keresztül 15 másodpercig 95°C-on és 1 percig 60 °C-on történt a felsokszorozás.

Eredményeinket az RQ (*relative quantity*) összehasonlításával kaptuk, melyhez az áttörési pontokat (CT: az a ciklusszám, ahol a minden egyes ciklusban detektált fluoreszcens jel exponenciálisan növekedni kezd) használtuk fel.

Western blot vizsgálat

160-180 g-os ivarérett nőstény Sprague-Dawley patkányok petefészkét eltávolítva, a RT-PCR vizsgálatnál leírt módon történt a kezelés, mely végzetével uterus mintákat gyűjtöttünk. A szöveteket Sartorius Mikro Dismembrator U készülékkel (Sartorius, Goettingen, Németország) elporítottuk és RIPA lízis pufferben homogenizáltuk, mely tartalmaz még nátrium-ortovanadátot, PMSF-et és proteáz inhibitor koktélt. A mintákat 10 percig 10.000 G fordulaton centrifugáltuk, majd a felülúszó frakcióból totál fehérjét mértünk. Zsebenként 20 µg fehérjét vittünk fel 4-12%-os NuPAGE Bis-Tris gélre (Life Technologies, Budapest, Magyarország) és XCell SureLock Mini-Cell Units (Life Technologies, Budapest, Magyarország) készülék-

ken elektroforézisnek vetettük alá. A gélen lévő szétválasztott fehérjét nitrocellulóz membránra transzformáltuk át iBlot Gel Transfer System (Life Technologies, Budapest, Magyarország) alkalmazásával. Az antitest kötődését WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit (Life Technologies, Budapest, Magyarország) segítségével detektáltuk. A membránt CRLR (Calcitonin Receptor-Like Receptor) és β-aktin poliklonális antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:200) rázógépen inkubáltuk a blokkoló pufferben. Az immunreaktív sávok optikai denzitásának meghatározása, a háttér intenzitás kivonása után Kodak 1D Images szoftverrel (Carestream Health, Rochester, NY, USA) történt.

Statisztika

A vemhességmegtartó teszt és a molekuláris farmakológiai vizsgálatok eredményeit Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) szoftver segítségével ANOVA Dunnett teszt alkalmazásával elemeztük. Az értékeket SEM-ben tüntettük fel, a szignifikancia $p < 0,05$ értéknél elfogadott.

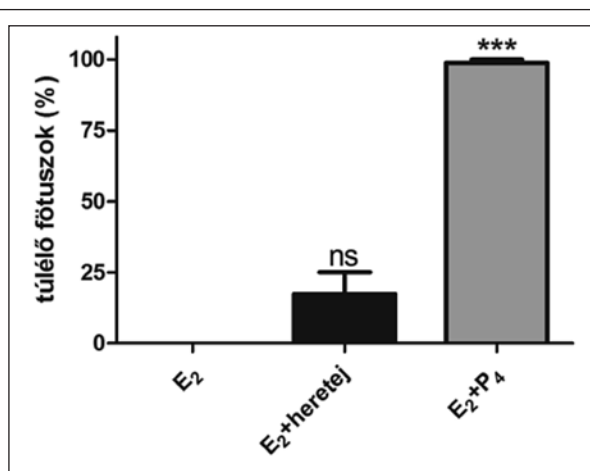
Eredmények

A vemhességmegtartó vizsgálatok során a 17β-ösztadiol-valerát adagolása önmagában (negatív kontroll) a fötuszok teljes elhalásához vezetett, míg kombinációja heretejjel a fötuszok 17,4%-ának életben maradását eredményezte. Habár a heretejjel történő kombináció számszerűen fokozta a túlélő fötuszok számát, szignifikáns hatásról mégsem beszélhetünk. Pozitív kontrollként alkalmazott 17β-ösztadiol-valerát és progeszteron kombinációja a fötuszok 98,8%-ának életben maradását eredményezte (1. ábra).

RT-PCR mérések eredményeként azt tapasztaltuk, hogy a heretej, a progeszteronhoz hasonlóan, szignifikánsan fokozza a CRLR mRNS-ének expresszióját (2. ábra).

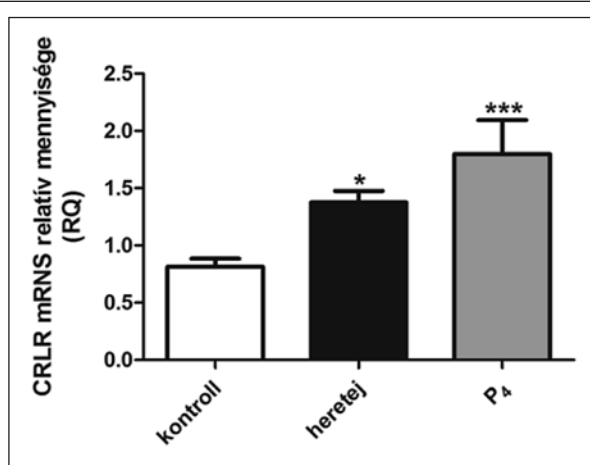
A Western blot mérések során is hasonló eredményeket kaptunk. Heretej kezelés hatására az uterusból izolált CRLR fehérje mennyisége megnövekedett, hasonlóan a pozitív kontrollként alkalmazott progeszteronhoz (3. ábra).

A további kísérleteinkben egy a heretejhez hasonlóan gyenge gesztagen hatású vegyület, a spironolakton hatását vizsgáltuk önmagában, ill. heretejjel kombinálva, mellyel célunk volt a heretej gesztagen hatásereőségének feltérképezése. RT-PCR vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a



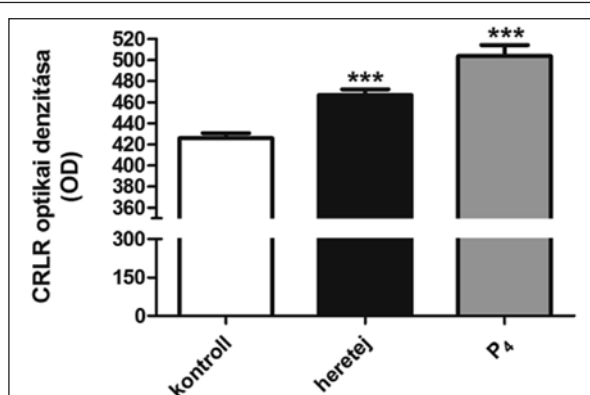
1. ábra: A heretej vemhességmegtartó hatása petefészekirtott vemhes patkányokban.

E₂: 17 β -ösztradiol-valerát; P₄: progeszteron; ns: nem szignifikáns; ***: $p < 0,001$



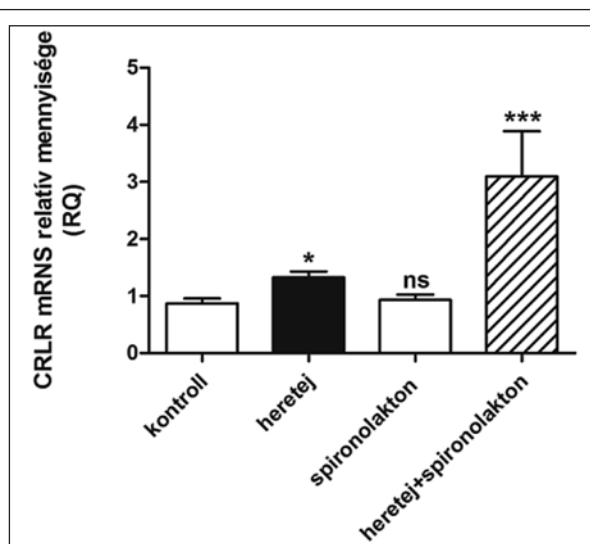
2. ábra: A Calcitonin Receptor-Like Receptor (CRLR) mRNA expressziójának változása a heretej kezelés hatására.

P₄: progeszteron; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$



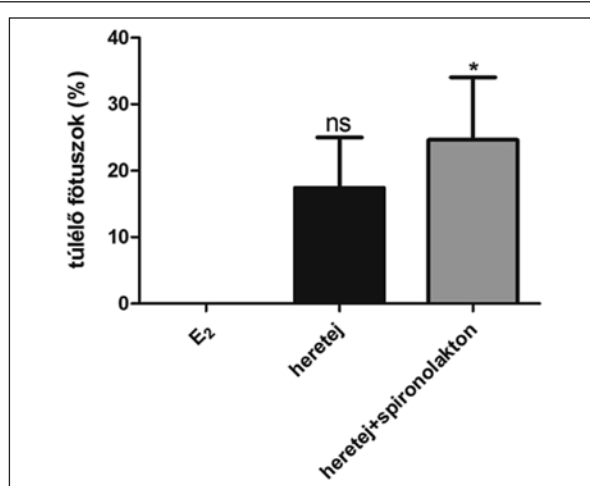
3. ábra: A Calcitonin Receptor-Like Receptor (CRLR) fehérje expressziójának változása a heretej kezelés hatására

P₄: progeszteron; ***: $p < 0,001$



4. ábra: A Calcitonin Receptor-Like Receptor (CRLR) mRNA expressziójának változása a heretej, a spironolakton ill. heretej-spironolakton kombinációs kezelés hatására

ns: nem szignifikáns; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$



5. ábra: A heretej-spironolakton kombináció vemhesség megtartó hatása petefészekirtott vemhes patkányokban

E₂: 17 β -ösztradiol-valerát; ns: nem szignifikáns; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$

spironolakton önmagában nem volt képes fokozni a CRLR mRNA-ének a mennyiségét, de kombinálva heretejjel jelentős CRLR mRNA szint növekedést figyeltünk meg. Ez a növekedés a heretej által kiváltott CRLR mRNA szintjének növekedését is nagymértékben felülmúlta (4. ábra). A spironolaktonnal végzett vemhességmegtartó teszt alapján azt találtuk, hogy az önmagában adagolt heretejhez hasonlóan (17,4%), spironolaktonnal kombinálva is csupán a főtuszok mintegy 21,4%-a maradt életben (5. ábra), de ez az eredmény már szignifikánsnak mutatkozott.

Az eredmények értékelése, következtetések

Korábbi kísérleteinkben sikeresen igazoltuk, hogy a nyers heretej ösztrogén és androgén hatást mutat patkányokban [11, 12]. Rendelkezésünkre állnak bizonyos méhészeti termékekről olyan publikációk, amelyek során a már megismert ösztrogénhatások mellett a vizsgált anyagok gesztagén hatást is mutattak. Kridli és mtsa leírták, hogy az egyébként igazolt ösztrogénhatással rendelkező méhpempő vemhes juhokban képes emelni a plazma progeszteron szintjét [15], így jelenlegi vizsgálatainkban célunk volt a heretej lehetséges gesztagén hatásainak feltérképezése, így téve teljessé a heretej nemi hormon hatásainak megismerését.

A vemhességmegtartó vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a heretej számszerűen emelte a túlélő főtuszok számát. Habár ez a változás nem volt szignifikáns, a túlélő főtuszok megjelenése mégis valamilyen gesztagénszerű hatást sejtetett, ezért további molekuláris vizsgálatokat végeztünk el az esetleges gesztagén hatás alátámasztására. RT-PCR vizsgálatainkban a Calcitonin Receptor-Like Receptor (CRLR) mRNS-ének a változását vizsgáltuk a fentebb említett kezelések hatására. Ismert, hogy CRLR mRNS szintje gesztagének adagolására fokozódik és mennyiségének változása petefészekirtott patkányokban is jól követhető. Habár a CRLR mRNS-ének a szintjét befolyásolhatja a heretej ösztrogén hatása, az összehatás mégis a gesztagén hatás irányába tolódik el, tehát gesztagén hatás jelenlétében a CRLR mRNS-ének a szintje emelkedni fog [16]. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a nyers heretej, a progeszteronhoz hasonlóan, fokozni képes a CRLR mRNS expresszióját. Az RT-PCR mérés eredményeit támasztotta alá a Western blot vizsgálat is, mely alapján a nyers heretej fokozta a CRLR fehérje mennyiségét a patkány uterusban.

A továbbiakban a heretej gesztagén hatásának erősségét próbáltuk feltérképezni, ezért egy már ismert gyenge gesztagén vegyülethez, a spironolaktonhoz hasonlítottuk a hatását. RT-PCR vizsgálataink során azt találtuk, hogy a spironolakton önmagában nem képes fokozni a CRLR mRNS-ének az expresszióját, ellenben kombinálva heretejjel jelentős hataserősödést tapasztaltunk. Ez a hatás jóval túlszárnyalta heretej önálló hatását, mintegy megháromszorozva azt. A vemhességmegtartó teszt során a kombinációs kezelés esetében nem ta-

pasztaltunk ilyen nagymértékű hataserősödést, a spironolaktonnal való kombináció a heretej kezeléséhez viszonyítva csupán kismértékben, azonban már szignifikánsan fokozta a túlélő főtuszok számát.

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a nyers heretej gyenge gesztagén hormonhatással bír patkányokban, melynek mechanizmusa jelenleg nem tisztázott. Feltételezhető, hogy eddig fel nem tárt gesztagén hatású hatóanyagai – a méhpempő ismert ösztrogén anyagaihoz hasonlóan – a nemi hormonok szintézisét végző gének működését módosítják és/vagy direkt hormonhatással is rendelkeznek. Nem zárható ki az sem, hogy a heretej ösztrogén vagy androgén hatásáért felelős komponensei rendelkezhetnek enyhe gesztagén hatással is. A pontos hatásmechanizmus feltárása azonban további kísérleteket igényel.

IRODALOM

1. Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Wahab, M. S.: *Int. J. Biol. Sci.* 8, 913-34 (2012).
2. Al-Waili, N. S., Salom, K., Butler, G., Al Ghamdi, A. A.: *J. Med. Food.* 14, 1079-96 (2011).
3. Kassim, M., Yusoff, K. M., Ong, G., Sekaran, S., Yusof, M. Y., Mansor, M.: *Fitoterapia.* 83, 1054-9 (2012).
4. Majtan, J., Bohova, J., Garcia-Villalba, R., Tomas-Barberan, F. A., Madakova, Z., Majtan, T., Majtan, V., Klaudiny, J.: *Arch. Dermatol. Res.* 305, 619-27 (2013).
5. Paul, I. M., Beiler, J., McMonagle, A., Shaffer, M. L., Duda, L., Berlin, C. M., Jr.: *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 161, 1140-6 (2007).
6. Zaid, S. S., Sulaiman, S. A., Sirajudeen, K. N., Othman, N. H.: *BMC Complement. Altern. Med.* 10, 82 (2010).
7. Kamakura, M.: *Nature.* 473, 478-83 (2011).
8. Suzuki, K. M., Isohama, Y., Maruyama, H., Yamada, Y., Narita, Y., Ohta, S., Araki, Y., Miyata, T., Mishima, S.: *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 5, 295-302 (2008).
9. Mishima, S., Suzuki, K. M., Isohama, Y., Kuratsu, N., Araki, Y., Inoue, M., Miyata, T.: *J. Ethnopharmacol.* 101, 215-20 (2005).
10. Bogdanov, S.: *The Bee Products: The Wonders of the Bee Hexagon.* (2011)
11. Seres, A. B., Ducza, E., Bathori, M., Hunyadi, A., Beni, Z., Dekany, M., Gáspár, R.: *J. Med. Food.* 16, 404-9 (2013).
12. Seres, A. B., Ducza, E., Bathori, M., Hunyadi, A., Beni, Z., Dekany, M., Hajagos-Tóth, J., Verli, J., Gáspár, R.: *J. Ethnopharmacol.* doi: dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.02.050 (2014)
13. Arkaravichien, W., Kendle, K. E.: *J. Reprod. Fertil.* 90, 63-70 (1990).
14. Elger, W., Beie, S., Pollow, K., Garfield, R., Shi, S. Q., Hillisch, A.: *Steroids.* 68, 891-905 (2003).
15. Kridli, R. T., Al-Khetib, S. S.: *Anim. Reprod. Sci.* 92, 75-85 (2006).
16. Thota, C., Gangula, P. R., Dong, Y. L., Yallampalli, C.: *Biol. Reprod.* 69, 1432-7 (2003).

A biohasonló gyógyszerek árversenyének tapasztalatai Magyarországon

HORNYÁK LAJOS^{1,2}, NAGY ZSOLT¹, TÁLOS ZSUZSANNA², ENDREI DÓRA^{1,3},
ÁGOSTON ISTVÁN¹, CSÁKVÁRI TÍMEA¹, BONCZ IMRE¹

¹Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar Egészségbiztosítási Intézet, Pécs (7621 Pécs, Mária utca 5-7.)

²Veszprém Megyei Csolnoky Ferenc Kórház, Klinikai Onkológiai Osztály (8200 Veszprém, Kórház utca 1.)

³Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ (7623 Pécs, Rákóczi út 2.)

*Levelező szerző: Prof. dr. Boncz Imre, PTE ETK Egészségbiztosítási Intézet, 7621 Pécs, Mária u. 5-7. E-mail: imre.boncz@etk.pte.hu

Summary

Hornyák, L.: Nagy, Zs., Tálos, Zs., Endrei, D., Ágoston, I., Csákvári, T., Boncz, I.: **Experiences with price competition of biosimilar drugs in Hungary**

Aim: The aim of our study is to analyse the biosimilar bids of the Hungarian National Health Insurance Fund Administration in case of colony-stimulating factor and erythropoietin products.

Data and methods: Data derived from the nationwide pharmaceutical database of Hungarian National Health Insurance Fund Administration. We analysed how the number of patients treated by colony-stimulating factor and erythropoietin products changed before (01.07.2011.-30.06.2012.) and after (01.07.2012.-30.06.2013.) the first biosimilar bid performed in March 2012 in Hungary.

Results: In the 12 months before biosimilar bid 4167 patients received erythropoietin treatment, while in the first 12 months after the bid 3647 patients, resulting in a 12.5 % decline. In the 12 months before biosimilar bid 13974 patients received colony-stimulating factor treatment, while in the first 12 months after the bid 13352 patients, resulting in a 4.5 % decline.

Conclusions: The analyses of the Hungarian price competition bid of biosimilar products showed a minimal decline in the number of patients under treatment by both colony-stimulating factor and erythropoietin products while the health insurance reimbursement of these drugs significantly decreased.

Keywords: biosimilar, price competition, reimbursement, bid, drug market, access.

Összefoglalás

Célkitűzés: Elemzésünk célja a magyar gyógyszerpiacon az Országos Egészségbiztosítási Pénztár biolicit eljárásának elemzése a kolónia-stimuláló faktor és erythropoietin készítmények területén.

Adatok és módszer: Elemzésünket az Országos Egészségbiztosítási Pénztár (OEP) gyógyszerforgalmi adatbázisa alapján végeztük el. Áttekintettük, hogy hogyan változott az első, 2012 márciusában lezajlott licitet követő első 12 hónapban (2012.07.01-2013.06.30.) az eljárást megelőző 12 hónaphoz képest (2011.07.01-2012.06.30.) a kolónia-stimuláló faktor és erythropoietin készítményekkel kezelt betegek száma.

Eredmények: A biolicit előtti 12 hónapban összesen 4167 beteg kapott erythropoietin kezelést, míg az azt követő első évben 3647 beteg. Ez 12,5% csökkenés a kezelt betegek számában. A biolicit előtti 12 hónapban összesen 13974 beteg kapott G-CSF kezelést, míg az azt követő első évében 13352 beteg. Ez 4,5% csökkenés a kezelt betegek számában.

Következtetés: A biolicit eljárásának elemzése azt mutatta, hogy a kolónia-stimuláló faktor és erythropoietin készítmények területén minimális betegszám csökkenés volt megfigyelhető a biolicit eljárás elindítását követően, míg a készítmények társadalombiztosítási ártámogatására fordított összeg jelentősen mérséklődött.

Kulcsszavak: biohasonló, árverseny, ártámogatás, licit, gyógyszerpiac, hozzáférés.

Bevezetés

A biotechnológiai úton előállított originalis, biológiai gyógyszerek szabadalmának lejáratát követően forgalomba kerülő, követő molekuláit nevezzük biohasonló készítménynek. A biohasonló készítmények több mint hét éve hozzáférhetőek az Európai Unió országaiban. A Sandoz Omnitrope (somatotropin) nevű készítménye volt 2006 áprilisában az első Európában törzskönyvezett biohasonló gyógyszer. Ezt követően kerültek törzskönyvezésre az erythropoietin és a kolónia stimuláló faktor (G-CSF) biohasonló készítmények. 2013. őszére az Európai Unióban 14 biohasonló terméket engedélyeztek [1].

„A generikus gyógyszerek esetében a hatóanyag azonosság bizonyítása alapfeltétel, melyből következik a biológiai hatások azonossága. Ezzel szemben a hasonló biológiai gyógyszerek esetén csak a molekula nagyfokú hasonlósága bizonyítható, ezért a hatóanyag hasonlóságát további összehasonlító biológiai vizsgálatokkal kell bizonyítani.” [2] A biohasonló gyógyszerek alkalmazásának gyakorisága és használatuk elterjedtsége országoként változó, és az egyes európai országok egészségügyi és gyógyszer finanszírozási rendszerének függvénye.

Haustein és munkatársainak tanulmánya szerint Franciaországban, Németországban, Olaszországban, Lengyelországban, Romániában, Spanyolor-

szágban, Svédországban és az Egyesült Királyságban 2007-2020 között 11,8-33,4 milliárd Euróra becsülük a biosimilar készítmények alkalmazásához kapcsolódó megtakarítás mértékét. [3].

A gyógyszerek közfinanszírozására fordítható keretek szűkülése igazolja a biohasonló terápiák létjogosultságát [4]. Hazánkban az elmúlt években részint az egészségügyi reformok keretében, részint a gazdasági válság hatására, jelentős hatások érték az egészségügyi rendszer finanszírozását, azon belül pedig a gyógyszerpiacot [5, 6, 7, 8, 9, 10].

Elemzésünk célja a magyar gyógyszerpiacon az Országos Egészségbiztosítási Pénztár biolicit eljárásának elemzése a kolónia-stimuláló faktor és erythropoietin készítmények területén.

Adatok és módszerek

Szabályozási környezet

A biológiai gyógyszerek szabadalmának lejáratát követően forgalomba kerülő biohasonló készítmények lehetőséget jelentenek az egészségbiztosító számára a költségek csökkentésére. Tekintettel a biohasonló és a generikus gyógyszerek közötti különbségekre, ezen a területen nem alkalmazható automatikusan a generikus gyógyszerek esetében bevált költségcsökkentési gyakorlat (negyedéves, féléves árlicit).

Magyarországon a magas költségű biológiai terápiák nagyobb részében a forgalmazókkal kötött egyedi ár- és támogatásvolumen megállapodásokkal kontrollálja az egészségbiztosító a költségeket. Ezen szerződések részletei nem publikusak.

A biológiai készítmények esetében – tekintettel a nagy molekulatömegű, bonyolult szerkezetű, fehérjét tartalmazó hatóanyagra – komoly problémát jelenthet az addig alkalmazott gyógyszer cseréjét követően esetleg kialakuló immunreakció. Ezért a biológiai gyógyszerek esetében nem javasolt egy beteg kezelése során a készítményváltás. Olyan szabályozást kellett kidolgozni, ami biztosítja, hogy az alacsonyabb költségű biohasonló gyógyszerek alkalmazása a kívánt költségcsökkentés érdekében elterjedhessen, ugyanakkor az originális gyógyszerekkel kezelt betegek a terápiájukat befejezhessék készítményváltás nélkül. Ugyancsak kerülendő a biohasonló gyógyszerek egymással történő felváltása finanszírozási okokból. A Magyarországon 2012. július 1-én életbe lépett, a biológiai gyógyszerek kijelölt csoportjaira vonatkozó szabályozás figyelembe vette ezen szempontokat. A rendszer bevezetését követően 3

hónapig biztosította a társadalombiztosítási támogatást a preferált készítmények közül kieső gyógyszerek részére annak érdekében, hogy a megkezdett gyógykezeléseket a betegek készítményváltás nélkül befejezhessék. Másrészről az árlicitre évente kerül sor – így csökkentve a gyakori készítményváltás kényszerét a betegek számára.

Az árlicit eredménye alapján preferált biológiai készítmény státuszt kap a legalacsonyabb áru és a tőle legfeljebb 10%-al magasabb árral beadott valamennyi készítmény. Ezek TB támogatása 100%-os és a betegek által fizetendő térítési díj nem lehet kevesebb, mint 300 Ft. A legalacsonyabb áru készítményhez képest a 10-30%-os ársávban levő termék is kap TB támogatást, a beteg térítési díja ezen csoport esetében legalább 1500 Ft, legfeljebb 3500 Ft.

A március 20-i árlicit alapján meghatározott árak 1 évig, minden év július 1. és a következő év június 30. között érvényesek.

A rendelet a preferált készítmények együttes, DOT-ban számolt részesedését is előírta egy ciklusra vonatkozóan: az első évben 40%, minden további évben pedig 70% [11].

A magyar egészségügyi rendszer felépítésének [12, 13, 14, 15, 16] és finanszírozási jellemzőinek [17, 18, 19, 20, 21] részletesebb bemutatása máshol megtalálható.

A biolicit eljárás elemzési módszertana

Az elemzésben szereplő adatok az Országos Egészségbiztosítási Pénztár finanszírozási adatbázisából származnak, és a 2011. július 1. és 2013. június 30. közötti időszakot fedik le.

Elemzésünk retrospektív jellegű volt, az OEP honlapján havi rendszerességgel közzétett nyilvános gyógyszerforgalmi adatsort dolgoztuk fel. Elemzésünk az érintett (járóbeteg, vényforgalmú) gyógyszer-támogatás kiadási kasszához tartozó kiáramlás általános jellemzőit vizsgálta. Nem volt célunk részletesebb, szakmacsoportokra (felnőtt és gyermek haematológia illetve onkológia) valamint betegségtípusokra (BNO alapú felírási indikáció) vonatkozó elemzés készítése. Jelen elemzés keretében szintén nem vizsgáltuk a támogatás kiáramlás változásának esetleges területi különbségeit.

Áttekintettük, hogyan változott az első, 2012 márciusában lezajlott licitet követő első 12 hónapban (2012.07.01-2013.06.30.) az eljárást megelőző 12 hónaphoz képest (2011.07.01. – 2012.06.30.) a fenti két csoport gyógyszerével kezelt betegek száma, illetve az ezen gyógyszerek társadalombiztosítási támogatás kiáramlása. Az elemzés során a

I. táblázat

A vizsgált készítmények ára a biolicit eljárás előtt (2012.06.30.) illetve után (2012.07.01.)

Hatóanyag	Gyógyszernev	Gyártó	Kiszerezés	Fogy.ár 2012.06.30.	Fogy.ár 2012.07.01.
filgrastim	NIVESTIM 48 M /0,5 ML	Aramis Pharma Kft.	5x0,5ml	83452	74370
filgrastim	NIVESTIM 30 M /0,5 ML	Aramis Pharma Kft.	5x0,5ml	52183	46541
filgrastim	ZARZIO 48 M /0,5 ML	Sandoz Hungária Kft.	5x0,5ml	83453	75183
filgrastim	ZARZIO 30 M /0,5 ML	Sandoz Hungária Kft.	5x0,5ml	52184	47013
eritropoietin	EPORATIO 30000 NE/1 ML	Teva Magyarország Zrt.	4x1ml	232418	232418
eritropoietin	RETACRIT 10000 NE/1,0 ML	Aramis Pharma Kft.	6x	116655	77556
eritropoietin	EPORATIO 20000 NE/1 ML	Teva Magyarország Zrt.	4x1ml	155243	155243
eritropoietin	EPORATIO 10000 NE/1 ML	Teva Magyarország Zrt.	6x1ml	116655	116655
eritropoietin	RETACRIT 30000 NE/0,75 ML	Aramis Pharma Kft.	1x	58774	38972
eritropoietin	RETACRIT 40000 NE/1,0 ML	Aramis Pharma Kft.	1x	78068	52002
eritropoietin	RETACRIT 20000 NE/0,5 ML	Aramis Pharma Kft.	1x	39480	26114
eritropoietin	RETACRIT 10000 NE/1,0 ML	Aramis Pharma Kft.	1x	20186	13260
eritropoietin	BINOCRIT 10000 NE/1,0 ML	Sandoz Hungária Kft.	6x1,0ml	94506	81347
eritropoietin	BINOCRIT 40000 NE/1,0 ML	Sandoz Hungária Kft.	1x1,0ml	70239	54231

preferált ársávban elhelyezkedő gyógyszerekhez kapcsolódó változást vizsgáltuk. Nem elemeztük részletesen azt a változást, melyet az okozott, hogy a licitet követően 2012. október 31-ig betegbiztonsági okokból még felírhatóak voltak a támogatásból egyébként kikerülő készítmények.

Eredmények

A biolicit eljárás általános tapasztalatai

A 32/2004. ESzCsM rendelet alapján az OEP az érintett csoportokban minden év március 1-én indít hivatalból eljárást. Az OEP először 2012. január 31-én tette közzé honlapján a biológiai gyógyszerek három terápiás csoportját, ahol a fenti eljárást bevezetni szándékozta. A szakmai szempontok alapján meghatározott csoportok: kolónia-stimuláló faktorok, erythropoietinek és a növekedési hormon (somatropin). 2012. február 3-án az első két csoport esetében került közzétételre a megelőző 1,5 év felhasználási adatait elemző háttéranyag, majd 2012. március 1-vel ezen két csoport vonatkozásában indult közigazgatási eljárás. A március 20-án megtörtént licit eredményeit tartalmazó táblázat másnap, 21-én került ki a honlapra (I. táblázat).

Az első árlicit eredményeképpen a 2012. július 1. és 2013. június 30. közötti időszakra az erythropoietinek csoportjában három biohasonló gyógyszer (Binocrit – Sandoz, Eporatio – Teva, Retacrit – Kéri Pharma) kapott preferált státuszt, míg valamennyi originális gyógyszer (Eprex – Janssen-Cilag, Neorecormon – Roche, Aranesp – Amgen) kiesett a támogatotti körből. A támogatásból kieső

originális gyógyszerek 3500 Ft-os térítési díj ellenében 2012. július 1. és október 30. között még hozzáférhetőek voltak azon betegek számára, akiknek kezelése korábban ezekkel a gyógyszerekkel kezdődött el.

A kolónia stimuláló faktorok esetében két biohasonló gyógyszer (Nivestim – Kéri Pharma, Zarzio – Sandoz) kapott preferált státuszt, egy biohasonló gyógyszer megmaradt a támogatotti körben és 1500 Ft-os térítési díj ellenében volt hozzáférhető a betegek részére (Ratiograstim – Teva). További egy biohasonló gyógyszer (Tevagrastim – Teva) és az originális készítmény (Neupogen – Amgen) pedig kiesett a támogatási körből 2012. november 1-vel.

A biolicit életbelépésekor sok kétely merült fel azzal kapcsolatban, hogy képesek lesznek-e a preferált gyógyszerek gyártói biztonsággal ellátni a piacot. A váltás zökkenőmentesen zajlott, ellátási problémák nem voltak.

Erythropoietin (ESA) készítmények forgalma

A biolicit előtti 12 hónapban összesen 4167 beteg kapott erythropoietin kezelést az OEP adatai alapján, míg az azt követő első évében 3647 beteg. Ez 12,5% csökkenés a kezelt betegek számában (II. táblázat). A biolicit előtt az ESA kezelésben részesülő betegek 17%-a kapott biohasonló gyógyszert, az azt követő első évben ez a szám 95%-ra emelkedett.

A biolicit előtti évben az erythropoietin gyógyszerekre költött összes támogatás 2,33 milliárd Ft volt, ez 47%-al csökkent az azt követő első évben és 1,23 milliárd volt (III. táblázat).

II. táblázat

ESA készítményekkel kezelt, TB támogatásban részesülő betegek száma a 2011.07.01-2012.06.30. (*) és a 2012. 07. 01-2013. 06. 30. (**) közötti időszakban

Készítmény	Betegszám			
	Biocitit előtti 12 hónap*	Biocitit utáni 12 hónap**	Betegszám változás	Betegszám változás (%)
Originális ESA-val kezelt betegek száma	3432	173	-3259	-95,0%
Biohasznló ESA-val kezelt betegek száma	735	3474	2739	372,7%
ESA összesen	4167	3647	-520	-12,5%

III. táblázat

ESA készítmények TB támogatása a 2011.07.01-2012.06.30. (*) és a 2012.07.01-2013.06.30. (**) közötti időszakban

Készítmény	TB támogatás			
	Biocitit előtt 12 hónap (mFt)*	Biocitit után 12 hónap (mFt)**	TB támogatás változás (mFt)	TB támogatás változás (%)
Originális ESA	2087	95	-1992	-95,5
Biohasznló ESA	249	1138	889	357,1
ESA összesen	2336	1232	-1104	-47,2

G-CSF készítmények forgalma

Megbeszélés

A biocitit előtti 12 hónapban összesen 13974 beteg kapott G-CSF kezelést az OEP adatai alapján, míg az azt követő első évében 13352 beteg. Ez 4,5% csökkenés a kezelt betegek számában (IV. táblázat). A biocitit előtt az ESA kezelésben részesülő betegek 34%-a kapott biohasznló gyógyszert, az azt követő első évében ez 81%-ra emelkedett.

A biocitit előtti évben a G-CSF gyógyszerekre költött összes támogatás 7,49 milliárd Ft volt, ez 44%-al csökkent az azt követő első évében és 4,19 milliárd Ft volt (V. táblázat).

A biohasznló gyógyszerek fejlesztése, gyártása és törzskönyvezési követelményei sokkal szigorúbbak a tradicionális generikus gyógyszerekénél. A biohasznló készítmények engedélyezési kérelmének a teljes gyógyszerminőségi adatokon kívül a referenciakészítménnyel (originális biológiai gyógyszer) történő összehasonlítást is tartalmaznia kell. Ezen kívül a készítmény elbírálásához – a generikumokkal ellentétben, ahol a gyógyszerminőségi dosszié és a bioekvivalencia-vizsgálat elegendő az engedélyezéshez – a gyógyszerminőségi

IV. táblázat

G-CSF készítményekkel kezelt, TB támogatásban részesülő betegek száma a 2011.07.01-2012.06.30. (*) és a 2012.07.01-2013.06.30. (**) közötti időszakban

Készítmény	Betegszám			
	Biocitit előtti 12 hónap*	Biocitit utáni 12 hónap**	Betegszám változás	Betegszám változás (%)
Originális G-CSF-el kezelt betegek száma	9253	2473	-6780	-73,3%
Biohasznló G-CSF-el kezelt betegek száma	4721	10879	6158	130,4%
G-CSF összesen	13974	13352	-622	-4,5%

V. táblázat

G-CSF készítmények TB támogatása a 2011.07.01-2012.06.30.(*) és a 2012.07.01-2013.06.30. (**) közötti időszakban

Készítmény	TB támogatás			
	Biocitit előtt 12 hónap (mFt)*	Biocitit után 12 hónap (mFt)**	TB támogatás változás (mFt)	TB támogatás változás (%)
Originális G-CSF	6469	1707	-4762	-73,6
Biohasznló G-CSF	1019	2480	1461	143,3
G-CSF összesen	7488	4187	-3301	-44,1

hasonlóságtól függően nemklinikai és klinikai vizsgálatokkal is igazolni kell a készítmény biztonságosságát és hatásosságát [22].

Magyarországon a 2012 júliusától érvénybe lépő, az első két biológiai csoport (kolónia-stimuláló faktorok és erythropoietinek) finanszírozására vonatkozó, úgynevezett biolicit eredményeként a csoportba tartozó készítmények társadalombiztosítási támogatására költött összeg 4,4 milliárd Ft-tal csökkent – 9,8 milliárd Ft-ról 5,4 milliárd Ft-ra – és ezzel 45%-al csökkentette a terület TB támogatási igényét. Eközben a készítményekkel kezelt betegek száma nem csökkent jelentősen. A G-CSF készítmények esetében 4%-os, az erythropoietinek esetében 12%-os volt a kezelt betegek számának csökkenése egy év alatt.

Fontos megemlíteni, hogy a G-CSF készítmények esetében 2012. augusztus 1-vel lényeges változás lépett életbe, mely szintén hozzájárult a korábbi költségek csökkentéséhez. A pegfilgrasztim készítmény (Neulasta, Amgen) társadalombiztosítási támogatással történő felírásának indikációi szűkültek. Primer profilaxisban egyáltalán nem, szekunder profilaxisban pedig csak meghatározott előfeltételek teljesülése esetén engedélyezett jelenleg. Ez a változás azt eredményezte, hogy a korábban az összes filgrasztim készítmény forgalmából 50% körüli standard unit részesedéssel rendelkező pegfilgrasztim részesedése 10% körüli értékre esett.

Mára nemzetközi szinten már több millió betegnap tapasztalat áll rendelkezésre ezekkel a gyógyszerekkel és az eddig elért eredmények azt bizonyítják, hogy a biohasonló gyógyszerek biztonságos és hatékony alternatíváját jelentik az originális biológiai terápiáknak. A biohasonló gyógyszerek ugyanakkor jelentős költség megtakarítási lehetőséget is jelentenek a finanszírozóknak. A biológiai gyógyszerek költsége megközelítőleg 70 milliárd USD az USA-ban és 60 milliárd EUR az EU-ban. [23, 24]

Összességében tehát elmondható, hogy a magyar biolicit eljárás során a kezelésbe bevont betegek száma kismértékben csökkent, míg az Országos Egészségbiztosítási Pénztár ártámogatásra kifizetett kiadásai jelentős mértékben csökkentek.

Megfontolandó lenne vizsgálni a biolicit eljárás további hatóanyagcsoportokra történő kiterjesztésének lehetőségét. A betegbiztonság érdekében, ezen gyógyszercsoportnál különösen fontos a farmakovigilancia ellenőrzése. Ugyanakkor cél-

szerű lenne a továbbiakban is követni a betegszám- és költség kiáramlás változást, különös tekintettel arra, hogy a 2013 márciusában lezajlott licit során nem változott a preferált készítmények köre.

IRODALOM

1. Konangi, S., Raviteja, M.N., Gupta, N.V.: *Int.J.PharmTech Res.* 5(3), 924-935 (2013).
2. Kerpel-Fronius, S.: *IME* 9(8), 52-58 (2010).
3. Hausteil, R., de Millas, C., Höer, A., Häussler, B.: *Generics and Biosimilars Initiative Journal (GaBI Journal)*. 1(3-4), 120-6 (2012).
4. Inotai, A., Nagy, B., Kaló, Z.: *Orvostovábbképző Szemle*. 19(12), 69-73 (2012).
5. Boncz, I., Sebestyen, A.: *Lancet* 368(9539), 917-918 (2006).
6. Baji, P., Boncz, I., Jenei, Gy., Gulácsi, I.: *Society and Economy*. 34(2), 221-240 (2012).
7. Kaló, Z., Boncz, I., Inotai, A.: *Journal of Health Policy and Outcomes Research*. 1, 20-26 (2012).
8. Boncz, I., Kaló, Z., Mohamed Ibrahim, M.I.B., Greenberg, D.: *Value Health Regional*. 2(2), 169-170 (2013).
9. Boncz, I., Donkáné Verebes, É., Oberfrank F.: *Acta Pharm. Hung.* 83(1), 28-32 (2013).
10. Dóczy, V., Mészáros, Á.: *Acta Pharm. Hung.* 83(1), 13-27 (2013).
11. 32/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet a törzskönyvezett gyógyszerek és a különleges táplálkozási igényt kielégítő tápszerek társadalombiztosítási támogatásba való befogadásának szempontjairól és a befogadás vagy a támogatás megváltoztatásáról
12. Gaal, P., Szigeti, S., Csere, M., Gaskins, M., Panteli, D.: *Health Syst. Transit* 13(5), 1-266 (2011).
13. Kaló, Z., Bodrogi, J., Boncz, I., Dózsa, C., Jóna, G., Kövi, R., Pásztélyi, Z., Sinkovits, B.: *Value Health Regional* 2(2), 264-266 (2013).
14. Gulácsi, L., Boncz, I., Drummond, M.: *Int. J. Technol. Assess. Health Care*. 20(3), 337-341 (2004).
15. Betlehem, J., Kukla, A., Deutsch, K., Marton-Simora, J., Nagy, G.: *Nurse Educ. Today* 29(2), 240-245 (2009).
16. Olah, A., Betlehem, J., Kriszbacher, I., Boncz, I., Bodis, J.: *J Adv Nurs*. 58(3), 301-2 (2007).
17. Boncz, I., Nagy, J., Sebestyen, A., Korosi, L.: *Eur. J. Health Econ*. 5(3), 252-258 (2004).
18. Ágh, T., Mészáros, Á.: *Acta Pharm. Hung.* 80(2), 75-80 (2010).
19. Boncz, I., Dózsa, C., Kalo, Z., Nagy, L., Borcsek, B., Brandtmüller, A., Betlehem, J., Sebestyen, A., Gulácsi, L.: *Eur. J. Health Econ*. 7(S1), 4-6 (2006).
20. Kriszbacher, I., Koppan, M., Bodis, J.: *N. Engl. J. Med.* 353(4), 429-30 (2005).
21. Gulácsi, L., Vas, G., Pinter, I., Kriszbacher, I.: *Int. J. Technol. Assess. Health Care*. 25(1), 109-110 (2009).
22. Buzás, Zs.: *Orvostovábbképző Szemle* 19(10), 73-79 (2012).
23. Hirsch, B.R., Lyman, G.H.: *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 9(8), 934-42 (2011).
24. Covic, A., Cannata-Andia, J., Cancarini, G., Coppo, R., Frazão, J.M., Goldsmith, D., Ronco, P., Spasovski, G.B., Stewinkel, P., Utas, C., Wiecek, A., Zoccali, C., London, G.: *Nephrol. Dial. Transplant.* 23(12), 3731-7 (2008).

Szerzői útmutató

Az *Acta Pharmaceutica Hungarica* a gyógyszerészeti tudományok területéről közöl eredeti, kísérletes kutatómunka eredményeit bemutató közleményeket, de fórumot biztosít összefoglaló és nem kísérletes (történeti, szervezési) tanulmányok, valamint Ph.D. és D.Sc. értekezések téziseinek közlésére is.

Hazai kutatóhelyek vagy olyan szerzői kollektívák magyar nyelvű kéziratait közöljük, ahol az első szerző magyar. Lehetőség van külföldi folyóiratban már megjelent, kiemelkedő jelentőségű közlemények magyar nyelvű változatának közlésére is, az első megjelenés időpontjától számított egy éven belül, az első közlés bibliográfiai adatainak megjelölésével.

Közlésre elfogadunk:

1. *Összefoglaló közleményeket*, legfeljebb 25 gépelt oldal terjedelemben. Ezek megírására általában a szerkesztőbizottság felkérésére kerülhet sor, illetve az erre irányuló szándékot célszerű előzetesen egyeztetni a szerkesztőbizottsággal.

2. *Közleményeket*, legfeljebb 12 gépelt oldal terjedelemben. Az ábrák és táblázatok együttes száma maximálisan 10 lehet.

3. *Rövid közleményeket*, legfeljebb 4 gépelt oldal terjedelemben (összesen legfeljebb 4 ábra és táblázat). A közlemények megjelenési sorrendjében a rövid közlemények előnyt élveznek.

4. *Ph.D. értekezések összefoglaló közleményét*, legfeljebb 25 oldal terjedelemben.

Felelősen nagy terjedelmű dolgozatok esetében a szerkesztőbizottság fenntartja magának a jogot arra, hogy a lektori javaslatok alapján a szerzőt felkérje dolgozatának rövid közleménnyé való átdolgozására.

A kézirat elkészítésének módja:

a) Általános szempontok

A kéziratot elektronikusan, csatolt file-ként kell a felelős szerkesztő e-mail címére elküldeni: zelrom@gytk.sote.hu

A táblázatokat külön file-ként, címmel és római sorszámmal ellátva készítsük.

Az ábrák és egyéb illusztrációk olyan színvonalon készüljenek, hogy azok nyomdai szerkesztésre alkalmasak legyenek. Az ábrákat külön file-ként kell csatolni, az elnevezésben az ábraszámokat fel kell tüntetni. Javasolt formátum: jpg, tiff.

Az irodalmi hivatkozásokat külön, a hivatkozások sorrendjében közöljük. A hivatkozási számot a szövegben tegyük szögletes zárójelbe.

A hivatkozások módja:

Folyóiratcikk:

1. Revelle, L. K., Musser, S. M., Rowe, B. J., Feldmann, I. C.: J. Pharm. Sci. 86, 631-634 (1997)

Szakkönyv:

2. Gyarmati L., Rác L., Plachy J., Csontos A.: A gyógyszer-technológia és biofarmácia kémiai ellenőrző módszerei. Medicina, Budapest, 1982. 147-152. old.

Könyvfejezet:

3. Ariens, E. J.: Racemates – an impediment in the use of drugs and agrochemicals. In: Krstulovic, A.M. (ed): Chiral Separations by HPLC. Ellis Horwood, Chichester, 1989. pp. 31–68.

Szabadalom:

4. U.S. Pat. 3 425 422 (1984)

Konferencia-előadás:

5. Duncan, R.: Polymer therapeutics: Targeting drugs and genes to tumours. 6th European Congress of Pharmaceutical Sciences. Eur. J. Pharm. Sci. 11, (2000) S1-S2.

Internetes hivatkozás: teljes URL-cím a keresőablakból kimásvolva és az elérés dátuma az alábbiak szerint:

6. <http://www.eum.hu/main.php?folderID=3746&objectID=6000268> [2008. 08. 05.] Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja - Gyógyszeres fájdalomcsillapítás és gyulladásgátlás a reumatológiai betegségekben.

Az idegen orvosi kifejezések helyesírásában Fábíán P. és Magasi P.: Orvosi helyesírási szótár. Akadémiai Kiadó, 1992. legyen az irányadó, a kémiai kifejezések nevezéktanára és helyesírására vonatkozóan pedig Erdey-Grúz T. és Csányi P.: A kémiai elnevezés és helyesírás szabályai. Akadémiai Kiadó, 1972.; F. Csányi P., Fábíán P. és Hőnyi E.: Kémiai helyesírási szótár. Műszaki Kiadó, 1982.; valamint F. Csányi P. és Simándi L.: Szervetlen kémiai nevezéktan. Magyar Kémikusok Egyesülete, 1995.

A mértékegységek megjelölésében az SI-mértérendszer szabályai az irányadóak.

b) A kézirat felépítése

A kézirat szerkesztéséhez a következő beosztást kérjük:

A *dolgozat címe* (esetleg alcíme).

A *szerző(k) teljes neve* (tudományos fokozatok nélkül), a szerkesztőséggel kapcsolatot tartó szerző neve csillaggal megjelölve.

A szerző(k) *munkahelye* teljes postai címmel, valamint a *levelező szerző e-mail címe*.

A *dolgozat magyar nyelvű összefoglalása*.

A magyar nyelvű összefoglalás terjedelme a dolgozat hosszától függően 10-20 sor legyen és az általános megfogalmazások kerülésével tartalmazza a dolgozat legfontosabb, konkrét megállapításait.

Kulcsszavak: A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó megadása.

A dolgozat *címe angol nyelven*, a szerző(k) neve (keresztnevek rövidítve).

Angol nyelvű összefoglalás.

Bevezetés, amely tartalmazza a munka célkitűzéseit, valamint a vizsgálatok előzményeiből és irodalmi háttéréből annyit, amennyi a dolgozat megértéséhez és értékeléséhez szükséges.

Key-words: A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó angol nyelvű fordítása.

Kísérleti rész, amely tartalmazza a felhasznált eszközök és anyagok, valamint a kidolgozott módszerek pontos leírását.

Eredmények.

A dolgozatok csak a leírt módszerek teljesítőképességét megfelelően dokumentáló adatokkal fogadhatók el. Ezek megadásánál használjuk a matematikai statisztika korszerű módszereit.

Az eredmények értékelése.

Ábracímek.

Következtetések. Az utóbbi két fejezet összevonható az Eredmények c. fejezettel.

Az esetleges **köszönetnyilvánítások.**

Irodalomjegyzék.

